

Aus dem Institut für kardiovaskuläre Physiologie und
Pathophysiologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. U. Pohl

Schubspannungsassoziierte vaskuläre NO-Freisetzung am
Modell des Meerschweinchenherzens

-

Rolle der endothelialen Glykokalyx

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Noseleit, geb. Lötsch

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil.
Bernhard F. Becker

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Johannes Tschöp
Prof. Dr. Fritz Krombach

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Markus Rehm

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2016

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Michael Noseleit, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende
Dissertation mit dem Thema:

Schubspannungsassoziierte NO-Freisetzung am Modell des
Meerschweinchenherzens - Rolle der endothelialen Glykokalyx

selbständig verfasst, mich, außer der angegebenen, keiner weiteren Hilfsmittel
bedient, und alle Erkenntnisse, die aus diesem Schrifttum ganz oder annähernd
übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter
Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre desweiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher
oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines
akademischen Grades eingereicht wurde.

Ostrhauderfehn, den 21.06.2016

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise bereits an anderer Stelle veröffentlicht:

- Jacob, Rehm, Loetsch et al. J. Vasc. Res. 2007, 44 (6) 435-43
- Bruegger, Jacob, Rehm et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005
289(5) H 1993-9
- Rehm, Zahler, Lötsch et al. Anesthesiology 2004 100(5): 1211-23

Inhalt

1. Einleitung.....	7
1.1 Struktur der endothelialen Glykokalyx.....	9
1.2 Funktion der endothelialen Glykokalyx.....	12
1.3 Kolloide als Volumenersatzmittel in der Klinik.....	14
1.4 Fragestellung.....	19
2. Methodik.....	20
2.1 Material.....	20
2.2 Präparation und Perfusion isolierter Herzen.....	21
2.3 Versuchsprotokolle.....	24
2.4 Bildgebung mittels Elektronenmikroskopie.....	26
2.5 Statistische Auswertung.....	27
3. Ergebnisse.....	28
3.1 Kolloide ohne Intervention.....	28
3.2 Kolloide nach Heparinase.....	31
3.3 Kolloide mit Nitro-L-Arginin.....	34
3.4 Kolloide mit Heparinase und NOLAg-Infusion.....	37
3.5 Kolloide nach Ischämie.....	40
3.6 Kolloide nach Heparinase und Ischämie.....	43
3.7 Nitro-L-Arginin ohne Kolloide.....	46
3.8 Elektronenmikroskopie.....	48

4. Diskussion.....	50
4.1 Das „Shedding“ – die Bedeutung der Glykokalyx in der Klinik.....	50
4.2 Die Bedeutung des NO-Systems.....	53
4.3 Die Ergebnisse im Kontext.....	59
4.4 Kritische Betrachtung der Methodik.....	67
5. Zusammenfassung.....	68
6. Abbildungsverzeichnis.....	72
7. Verzeichnis der Abkürzungen.....	74
8. Literaturverzeichnis.....	76
9. Danksagung.....	85

1. Einleitung

In den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde von Danielli sowie Chambers und Zweifach zum ersten Mal die Theorie aufgestellt, dass eine 'kontinuierliche Plasmamembran' bzw. 'adsorbierte endokapilläre Proteinschicht' der Endothelzellen einen Einfluss auf die vaskuläre Permeabilität haben könnten (Danielli 1940, Chambers und Zweifach 1947). Diese alsbald Glykokalyx genannte, äußerst fragile Struktur ließ sich über lange Zeit mikroskopisch nicht darstellen, lediglich als Exklusionszone für Erythrozyten in Kapillaren konnte man sie indirekt vermuten. In Gefäßen mit einem Durchmesser von 7-10 μm bezeichnete man dieses Phänomen als Fåhræus-Lindqvist-Effekt: es kommt hier zu einer scheinbaren Abnahme der Viskosität des Blutes. Wurde dieser Effekt initial rein physikalisch erklärt, nämlich, dass durch die Axialmigration der korpuskulären Bestandteile diese in der Mitte des Blutstroms geringeren Scherkräften ausgesetzt sind und somit eine zellarme Gleitschicht entsteht, welche die Viskosität des Blutes reduzieren würde, konnten Desjardins und Duling 1990 zeigen, dass eine Destruktion der Glykokalyx mittels Heparinase zu einem deutlichen Anstieg des kapillaren Hämatokrits führte (Desjardins et al. 1990, Pries und Secomb 2005). Erst einige Jahrzehnte nach ihrer Erstbeschreibung ließ sich diese Schicht, die wir heute als endotheliale Glykokalyx bezeichnen, mit Hilfe immer modernerer Techniken zunehmend besser darstellen. Wurde sie anfangs noch aufgrund einer geschätzten Dicke von 20nm für die Mikrozirkulation als weitgehend irrelevant eingeschätzt, konnten aktuelle elektronenmikroskopische Untersuchungen mit neuen Fixierungstechniken eine Dicke von 100-750nm, in großen Gefäßen sogar eine Glykokalyx mit einer Dicke von bis zu mehreren μm nachweisen (Arkill et al. 2012, Ebong et al. 2011 de Mesy 2011, Chappell, Jacob, Paul et al. 2009, Reitsma et al. 2007); die Glykokalyx ist teilweise also dicker, als die Endothelzellen selbst. Das Gesamtvolumen der endothelialen Glykokalyx im menschlichen Körper wird auf ca. 1,7 Liter

geschätzt. Ihr kommt demzufolge eine deutlich größere Funktion im Rahmen der vaskulären Regulation zu, als ursprünglich vermutet worden war (Rehm et al. 2004, Fels et al. 2014).

1.1 Struktur der endothelialen Glykokalyx

Die endotheliale Glycocalyx ist eine Struktur aus Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glycosaminoglykanen (GAG) welche das luminale Endothel von Blutgefäßen bedeckt. In diesem Netzwerk sind zusätzlich lösliche Plasmaproteine integriert. Dabei steht die Glykokalyx mit dem zirkulierenden Plasmavolumen in einem dynamischen Gleichgewicht. Zudem findet ein kontinuierlicher Verlust ('shedding') und eine Neusynthese ihrer Komponenten statt (Tarbell und Pahakis 2007, Reitsma et al. 2007, Annecke et al. 2010).

Proteoglykane stellen nach aktueller Einschätzung den wichtigsten Anteil des Grundgerüsts der Glykokalyx dar. Sie bestehen aus einem Kernprotein, mit welchem eine oder mehrere, teils auch verschiedenartige, Glykosaminoglykan-Seitenketten kovalent verbunden sind. Diese Kernproteine sind meist fest mit der Zellmembran verbunden (Syndecane, 4 Subtypen und Glypicane, 6 Subtypen), es existieren jedoch auch lösliche Proteoglykane (z.B. Perlecan, Mimecan), die in der Glykokalyx gebunden sind oder ins Blut diffundieren können (Reitsma et al. 2007).

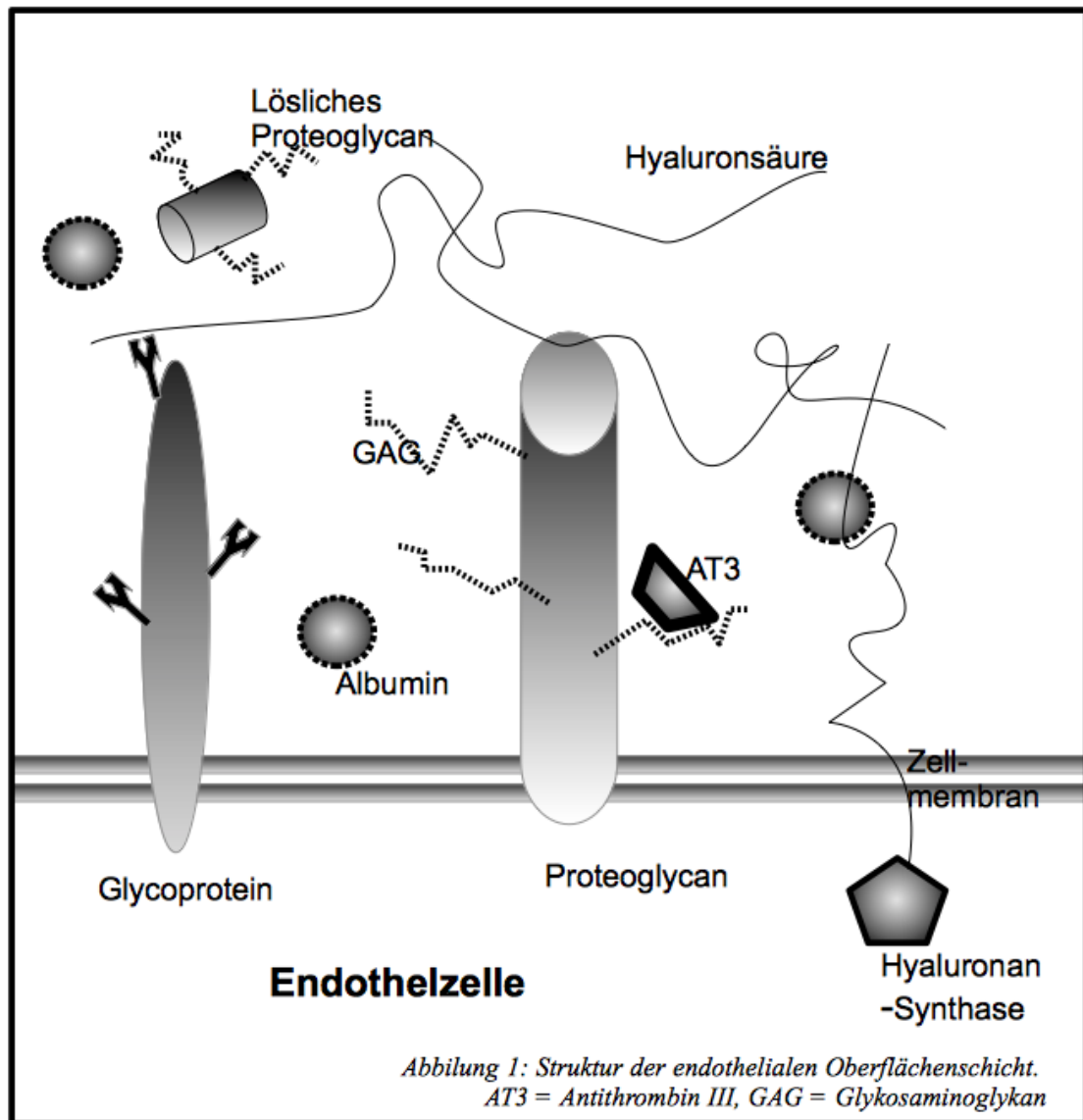
Es sind fünf verschiedene Arten von Glykosaminoglykan in der Glykokalyx bekannt: Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat (=Typ-B-Chondroitinsulfat), Keratansulfat und Hyaluronsäure. Die Heparansulfate bilden hierunter, mit einem Anteil von 50-90%, die größte Fraktion. Diese Zahl ist variabel, da die Synthese von Proteoglykanen durch die Endothelzellen von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. Mengenmäßig an zweiter Stelle stehen die GAG Chondroitin/Dermatansulfat. Üblicherweise besteht ein 4:1-Verhältnis von Heparansulfat zu Chondroitinsulfat. Durch Sulfatgruppen erhalten diese GAG und damit die endotheliale Glykokalyx insgesamt eine stark negative Ladung.

Hyaluronsäure ist ein weiterer wichtiger Baustein der Glykokalyx; dieses Molekül ist jedoch im Unterschied zu den anderen Glykosaminoglykanen nicht über ein Kernprotein mit der Endothelzelle verbunden. Es dient der Quervernetzung, kann entweder an den CD44-Rezeptor

auf der Zellmembran binden, oder aber an die Hyaluronan-Synthase angeheftet bleiben, welche sich auf der cytosolischen Seite der Zellmembran befindet.

Glykoproteine stellen einen anderen relevanten Teil des Grundgerüsts der endothelialen Glykokalyx dar. Ähnlich wie bei den Glykosaminoglykanen schwankt die Expression verschiedener Glykoproteine in Abhängigkeit von Zellaktivierung und Stimuli. Unter den Glykoproteinen gibt es verschiedene Klassen und Untergruppen, unter anderem endotheliale Zelladhäsions-Moleküle (Selectine, Integrine, Immunglobuline) sowie Anteile des Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systems. Diese sind aber in die tieferen Schichten der Glykokalyx eingebettet und stehen vermutlich bei unbeeinträchtigter Glykokalyx für eine Aktivierung üblicherweise nicht zur Verfügung (Reitsma et al. 2007).

Es muss dabei beachtet werden, dass die endotheliale Glykokalyx lediglich als „Skelett“ fungiert; erst zusammen mit löslichen Plasmaproteinen, z.B. Albumin und Orosomucoid bildet sie den 'endothelial surface layer' (ESL) und erfüllt so unterschiedlichste Funktionen. Das im ESL gebundene Plasma macht bis zu 25% des absoluten Plasmavolumens, beim Erwachsenen also ca. 800 ml, aus; eine schematische Darstellung der Glykokalyx ist in Abbildung 1 zu sehen. (Rehm et al. 2001, Jacob, Conzen et al 2007, Reitsma et al. 2007, Sörensson et al. 1999, Becker et al. 2010, Chappell et al. 2005).



1.2 Funktion der Glykokalyx

Die Glykokalyx hat durch ihre Position zwischen Gefäßlumen und Oberfläche der Endothelzellen eine Schlüsselfunktion inne. Sie fungiert als zweite kompetente Gefäßbarriere zusätzlich zu den Endothelzellen selbst: wird die Glykokalyx geschädigt, die Endothelzelle selbst bleibt aber unbeeinträchtigt, so kommt es allenfalls zu einer geringen Ödembildung. Auch in Umkehr, falls die Endothelzellen z.B. durch eine Ischämie Stress erleiden, die Glykokalyx aber nicht durch andere Mediatoren alteriert wird, kommt es zu keiner nennenswerten Extravasation von Flüssigkeit (Rehm et al. 2004, Rehm 2003, Chappell, Jacob, Becker et al. 2008). Jacob et al. sowie Woodcock et al. zeigten auf, dass die endotheliale Glykokalyx einen wichtigen Faktor innerhalb der Starling-Gleichung bezüglich des transmembranösen Konzentrationsgradienten für Flüssigkeitsaustausch darstellt, und daß die Auswahl verschiedener kolloidaler Infusionslösungen Einfluss auf die Ausbildung von Ödemen hat (Jacob, Bruegger et al. 2007, Woodcock und Woodcock 2012, Reitsma et al. 2007). Durch ihre stark negative Ladung aufgrund der hochgradigen Sulfatierung der integrierten Glykosaminoglykane, stellt die Glykokalyx auch eine elektrostatische Barriere für Makromoleküle wie beispielsweise Dextrane dar und reguliert somit deren Filtration. Rehm et al. und Jacob et al. demonstrierten, dass Albumin und HES bei vorhandener Glykokalyx ein vaskuläres Leck verhindern konnten, die Glykokalyx mußte also, in diesen Versuchsreihen mit kolloidfreier Perfusionslösung, erst einmal mit Kolloiden „aufgeladen“ werden, um ihre Funktion zu erfüllen; Albumin zeigte hierbei den stärkeren Effekt (Rehm et al. 2004, Jacob et al. 2006, Jacob, Rehm et al. 2007, Reitsma et al. 2007).

Mehrere antikoagulatorisch wirksame Faktoren können an sie binden, nämlich Antithrombin III, Heparin Cofaktor II und tissue factor pathway inhibitor (TFPI). Antithrombin verfügt über eine stark hemmende Wirkung auf Thrombin (Faktor IIa) und auf die Faktoren IXa und Xa. ATIII kann an Heparansulfat binden, was dessen antikoagulatorische Wirkung weiter

verstärkt. Heparin Cofaktor II wird durch Dermatan-sulfat in der Glykokalyx aktiviert und fungiert als thrombinspezifischer Proteaseinhibitor. TFPI fungiert als Inhibitor der Faktoren VIIa und Xa. Vermutlich bindet es über Heparansulphate an die Glykokalyx (Reitsma et al. 2007). Membranständiges Thrombomodulin wird von den Endothelzellen synthetisiert und kann als Glykokalyxbestandteil Thrombin in einen Aktivator der Protein-C-Kaskade konvertieren, was aus dem Gerinnungsfaktor Thrombin effektiv ein Antikoagulum werden lässt. All diese in der Glykokalyx vorhandenen Faktoren tragen zu einer stark antithrombotischen Wirkung eines gesunden Endothels bei. Zudem hat die Glykokalyx einen deutlichen Einfluss auf die Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion. Dies wird alleine schon deshalb realisiert, weil das Ausmass der Glykokalyx (200 – 1000nm) die Reichweite der Adhäsionsmoleküle (maximal 20nm) bei weitem überschreitet (Becker et al. 2010)

Desweiteren moduliert die Glykokalyx auch maßgeblich die Inflammation: sie bindet Cytokine bzw. reduziert deren Interaktion mit endothelständigen Rezeptoren. Durch die in ihr gebundenen Enzyme wie Superoxyd-Dismutase ist sie außerdem in der Lage den Anfall von O_2 -Radikalen zu verringern (Reitsma et al. 2007). Bereits hierdurch wird die Verfügbarkeit des potenten Vasodilatators Stickoxid (NO) verbessert: O_2^- und NO reagieren spontan zu Peroxynitrit ($ONOO^-$), ein oxidativ schädigendes Agens ohne protektive Wirkungen.

Einen Aspekt stellt die durch Schubspannung erzeugte Freisetzung von NO aus Endothelzellen dar. Es erscheint gut möglich, dass die Glykokalyx die Signalübertragung vermittelt und somit zur Endothel-vermittelten Vasodilatation entscheidend beiträgt.

1.3 Kolloide als Volumenersatzmittel in der Klinik

Während der europäischen Choleraepidemie 1831 war Thomas Latta der erste Arzt, der eine intravenöse Kochsalzinfusion, noch 50 Jahre vor Sydney Ringer, erfolgreich am Menschen einsetzte (Latta 1832, Bagchi und Eikermann 2013). Kristalloide Infusionslösungen können verlorenes Blutvolumen nur relativ ineffizient ersetzen, da sie sich, mangels kolloidosmotisch wirksamer Moleküle, nach intravaskulärer Infusion rasch über den gesamten Extrazellulärraum verteilen – ihr Volumeneffekt bleibt, gemessen am infundierten Volumen, mit 15 - 25 % relativ gering (Nolan 1999, Jacob et al. 2012).

Kolloide sind nach wie vor ein essentieller Bestandteil einer Infusionstherapie und werden weltweit zum Volumenersatz bei Hypovolämie und größeren Blutverlusten eingesetzt. Gummi arabicum war die erste Substanz, die zu Beginn des 20. Jahrhunderts für diesen Zweck entwickelt wurde und während des Ersten Weltkriegs Verwendung fand. Aufgrund seiner hochgradig antigenen Wirkung waren anaphylaktische Reaktionen jedoch sehr häufig. Ebenfalls zu dieser Zeit wurden die ersten Gelatinepräparationen entwickelt, auch diese fanden in den Kriegslazaretten Verwendung (Waxman et al. 1985). Im Verlauf der nächsten Jahrzehnte wurden immer weitere kolloidale Infusionslösungen entwickelt: Dextrane, Perfluorchemikalien-Emulsionen, Gelatine, stromafreie Hämoglobinlösungen, Hydroxyethylstärke und Albuminpräparationen. Von diesen sollen die beiden in Deutschland gebräuchlichsten kurz beschrieben werden, da diese, aufgrund ihrer weiten Verbreitung, auch in den Experimenten der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Humanalbumin ist ein aus 580 Aminosäuren bestehendes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 65-69 kD. Der Albumingehalt des menschlichen Plasma liegt bei circa 3,5-5 g/dl. Es übernimmt Transportfunktionen (u.a. Fettsäuren, Bilirubin und Hormone), fungiert als Puffersäure im Säure-Base-Haushalt, dient als Radikalfänger und interagiert mit dem Gerinnungssystem. Beim Gesunden trägt Albumin zu 80% des onkotischen Druckes bei.

Albuminlösungen sind in Konzentrationen von 4% - 25% erhältlich. Humanalbumin wird aus gepooltem Plasma gewonnen; das gewonnene Albumin wird erhitzt und ultrafiltriert, so dass ein Infektionsrisiko als äußerst gering angesehen wird. In Großbritannien jedoch wird Albumin aufgrund der theoretischen Möglichkeit der Übertragung der Prionen-basierten Creutzfeld-Jakob-Erkrankung nicht mehr hergestellt und statt dessen aus den Vereinigten Staaten importiert. Albuminlösungen sind deutlich teurer als andere gebräuchliche Kolloide, ihre Verfügbarkeit ist zudem aufgrund ihrer Gewinnung aus Spenderblut limitiert (Nolan 1999, Vincent und Gottin 2011, Boldt und Suttner 2005).

Hydroxyethylstärke (HES) wurde 1957 von Wiedersheim vorgestellt und 1962 von Thompson et al. für die Verwendung in der Klinik hergestellt. Hespan® (DuPont Pharmaceuticals, Wilmington, DE) war eine Hydroxyethylstärkepräparation mit einem Molekulargewicht von 450 kD und die Substanz der ersten Generation, welche 1970 in den Vereinigten Staaten eingeführt wurde (Westphal et al. 2009). Grundbaustein von HES ist Stärke, ein Polysaccharid, welches Pflanzen als Energiespeicher dient. Stärke besteht aus α -D-Glucose-Einheiten und hat die Formel $(C_6H_{10}O_5)_n$. Pflanzliche Stärke besteht zu ca. 25% aus Amylose, lineare Ketten mit helikaler Struktur, in der Glukosemoleküle α -1,4-glykosidisch verknüpft sind, sowie zu ungefähr 75% aus dem stark verzweigten Amylopektin mit α -1,4-glykosidischen sowie α -1,6-glykosidischen Bindungen der Glukose. Die Infusion von Amylopektin wird vom Organismus zwar gut vertragen, jedoch wird das Molekül sehr rasch durch Amylase gespalten, die Halbwertszeit des Moleküls *in vivo* beträgt nur ca. 20 Minuten (Waxman et al. 1985). Daher wurden die Glucosegruppen durch Hydroxyethylierung modifiziert, um den enzymatischen Abbau zu verlangsamen - die eigentliche Hydroxyethylstärke war geboren.

Es existieren ganz verschiedenartige Typen von HES-Infusionslösungen, welche sich durch mehrere Faktoren voneinander unterscheiden:

- Substitutionsgrad: Das Verhältnis von Hydroxyethyl-Gruppen im Verhältnis zu den Glukosegruppen: 0,7 bedeutet hierbei im Mittel 7 Hydroxyethylgruppen pro 10 Glukosemoleküle. Je höher der Substitutionsgrad, desto höher ist auch die intravaskuläre Halbwertszeit.
- Das C2/C6-Verhältnis beschreibt die relative Verteilung der substituierten Gruppen am Glukosering. Je höher das Verhältnis zugunsten der C2-Konfiguration, desto länger ist die intravaskuläre Verweildauer, da C6-Bindungen schneller durch α -Amylase gespalten werden, als C2-Bindungen.
- Molekulargewicht der HES-Moleküle: Es existieren Präparationen mit durchschnittlichen Molekulargewichten von 70 bis 450 kD. Ein höheres Molekulargewicht bedingt eine längere intravaskuläre Verweildauer.
- Konzentration der HES-Moleküle in der Infusionslösung: Es sind Präparate mit 6 und 10%igem HES-Anteil erhältlich (Nolan 1999).

Die HES-Präparationen machten eine Entwicklung durch: Lösungen der sogenannten 1. Generation hatten ein Molekulargewicht von ca. 450 kD und einen Substitutionsgrad von 0,7. In der 2. Generation betrug das Molekulargewicht noch 200 kD bei einer Substitution von 0,5-0,6. Aktuell werden hauptsächlich noch Lösungen der 3. Generation verwendet; diese haben ein MW von 130 kD und eine Substitution von ca. 0,4 (Rehm 2013). HES-Moleküle mit einem Molekulargewicht von 60kD und weniger werden glomerulär filtriert; größere Moleküle werden durch Amylase gespalten, bevor sie renal eliminiert werden.

HES ist als Kolloid insofern gut verträglich, als dass es im Gegensatz zu Dextranen so gut wie nie als Antigen fungiert; daher sind allergische Reaktionen extrem selten. Jedoch zeigten sich im Lauf der Jahre diverse andere, durch HES induzierte Nebenwirkungen, welche sich auch durch modernere HES-Varianten der sogenannten zweiten und dritten Generation nicht komplett beseitigen ließen.

HES-Moleküle haben eine vergleichsweise lange intravasale Verweildauer, neigen jedoch im Verlauf zur Akkumulation im retikulo-endothelialen System und können Pruritus auslösen. Dieser tritt meist erst Wochen oder Monate nach HES-Applikation auf, kann für 12 bis 24 Monate anhalten und hat das Potential, die Lebensqualität des Patienten massiv zu beeinträchtigen (Nolan 1999, Rehm 2013). Weit wichtiger ist die Tatsache, dass HES, insbesondere die höhermolekularen Produkte (HES 450.000), zu einer Reduktion von Faktor VIII und von-Willebrandt-Faktor führt, und dosisabhängig eine relevante Koagulopathie induziert, bis an den Punkt lebensbedrohlicher spontaner Blutungen. Dies ist jedoch speziell in dem Setting, für welches kolloidale Infusionslösungen entwickelt wurden, nämlich lebensbedrohlicher Blutverluste, ein schwerwiegender Nachteil (Chappell, Bruchelt et al. 2008, Kozek-Langenecker 2005). Zudem wurde auch relevante langdauernde Knochenmarksdepression beschrieben. Die weitaus schwerste Nebenwirkung dieser Substanzgruppe war jedoch, dass der Einsatz von HES zu einer dosisabhängigen Nierenschädigung führte. Infolgedessen ist seit kurzem der Einsatz von HES beim kritisch Kranken kontraindiziert (Nolan 1999, Schlimp et al. 2013, Chappell, Jacob, Hofmann-Kiefer et al. 2008, Chappell, Jacob, Becker et al. 2008, Rehm 2013, Bansal et al. 2013, Finfer 2014, Cortes et al. 2014, McDermid et al. 2014).

Da kolloidale Infusionen weltweit klinisch eingesetzt werden, ist die experimentelle Untersuchung ihrer Effekte – gerade auch in der Mikrostrombahn, von großer Bedeutung. Kolloide weisen grundsätzlich eine deutlich höhere Viskosität als kristalloide Infusionslösungen auf. Damit aber könnten sie eine schubspannungsinduzierte NO-Freisetzung – und über diesen Mechanismus dann auch eine Vasodilatation – in vivo aufrecht erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun die Auswirkung zweier exemplarischer Kolloide - Humanalbumin und Hydroxyethylstärke (MW 450 kD) - auf die vom Endothel vermittelte Vasodilatation untersucht. Um einen möglichst großen Effekt zu erzielen, wurde HES mit einem Molekulargewicht von 450 kD gewählt, eine Substanz, welche zum Zeitpunkt der Untersuchung, in Europa klinisch bereits keinen Stellenwert mehr besaß. Durch seine besondere Molekülgröße konnte allerdings über die Erzeugung von Schubspannung ein stärkerer Effekt auf die endotheliale Glykokalyx erwartet werden, als durch modernere Präparationen mit niedrigerem Molekulargewicht. Die Experimente in der vorliegenden Arbeit fanden in den Jahren 2001 – 2004 statt, zu einem Zeitpunkt, als die schubspannungsassoziierte Glykokalyx-vermittelte NO-Freisetzung zwar vermutet wurde, jedoch noch nicht bewiesen war.

Als Modellsystem wurde das isoliert perfundierte Herzpräparat (Meerschweinchen) gewählt. Dieses verfügt über ein komplettes Gefäßbett (Koronarsystem) und erlaubt es, Parameter der Gefäßpermeabilität (Flüssigkeits- und Kolloid-Durchlässigkeit) sowie des Gefäßtonus (Koronarfluß bzw. Koronarwiderstand) gleichzeitig zu ermitteln.

1.4 Fragestellung:

- Wie ändert sich die Menge an Transsudat, ein Maß für die Nettofiltration aus dem Gefäßbett, sowie die Menge an Coronareffluat, ein Maß für die coronare Perfusion, durch den Einsatz von Nitro-L-Arginin zur Blockade der schubspannungsabhängigen NO-Synthese unter Verwendung verschiedener Kolloide?
- Kann eine residuale Glykokalyx nach Vorbehandlung mit Heparinase noch eine schubspannungsabhängige Vasodilatation auslösen, oder ist die Wirkung der Kolloide nach Entfernung der Glykokalyx sogar größer, bedingt durch direkte Einwirkung auf die Endothelzelle?

2. Methodik

2.1 Material

Alle Versuchsherzen stammten von männlichen Meerschweinchen mit einem Körpergewicht zwischen 250 und 350g (*Fa. Harlan & Winkelmann, Borken, Deutschland*). Bis zum Versuchsbeginn erhielten die Tiere Trockenfutter, Heu und Wasser zur freien Verfügung.

Die Perfusionslösung für die Langendorff-Versuchsanordnung wurde mit einer Gasmischpumpe (*Fa. Wösthoff, Bochum, Deutschland*) äquilibriert.

Der Koronarfluss der Herzen wurde mittels eines Flussmesskopfes (*Transsonic Systems Inc., Ithaca, USA*) duplexsonographisch bestimmt.

Die einzelnen Kolloide wurden mit einem Perfusor appliziert (Perfusor® Secura; *Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland*). Für die Applikation von Heparinase und oder NOLAg kam ebenfalls ein Perfusor (Precidor, *Infors AG, Basel, Schweiz*) zum Einsatz.

Als Infusionslösungen für die Versuchsgruppen mit Kolloid-Applikation wurden entweder 5%iges Humanalbumin (*Centeon Pharma GmbH, Marburg, Deutschland*) oder Hydroxyethylstärke mit einem Molekulargewicht von 450kD und einem Substitutionsgrad von 0,7-0,8 (Plasmasteril, *Fa. Fresenius, Bad Homburg, Deutschland*) verwendet.

Für die Intervention *Heparinase* kam Heparinase I (*Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland*; pH-Optimum bei pH = 7,5) zum Einsatz.

Die Darstellung der Glykokalyx erfolgte nach Fixierung mit Hilfe eines Elektronenmikroskops (*Philips CM 10, Aachen Deutschland*).

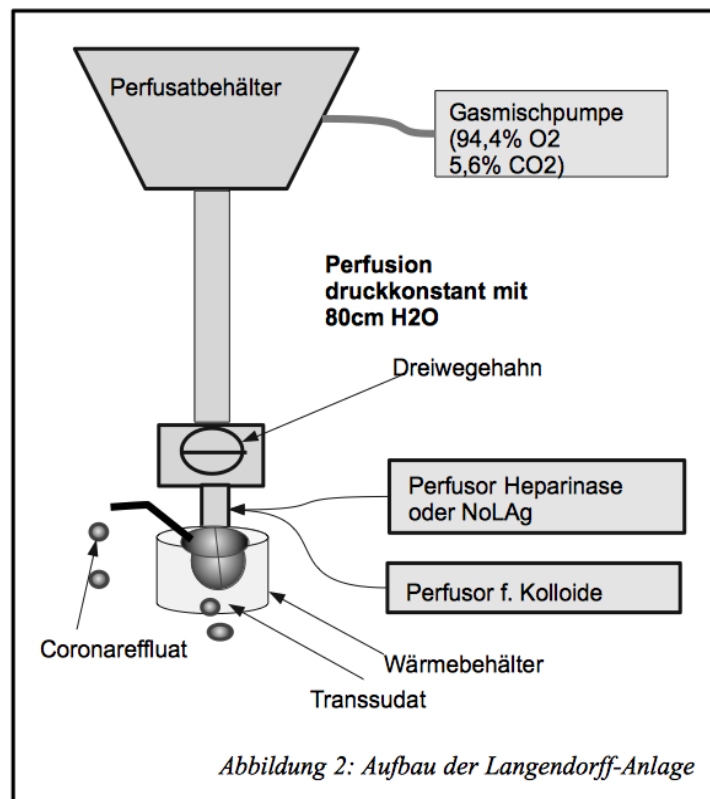
2.2 Präparation und Perfusion isolierter Herzen

Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Es lag eine Genehmigung der Regierung von Oberbayern vor (Az.: 209.1/211-2531.3-3/99). Die Herzen der Versuchstiere wurden nach Langendorff-Schema präpariert und druckkonstant bei 80cm H₂O perfundiert (Heindl et al. 1999). Die Perfusion erfolgte mit einem modifizierten, proteinfreien Krebs-Henseleit-Puffer: NaCl 126mmol/l; NaHCO₃ 24mmol/l; KCl 4,7mmol/l; MgSO₄ x 7H₂O 0,6mmol/l; CaCl₂ x 2H₂O 1,25mmol/l; KH₂PO₄ 1,2mmol/l; Pyruvat 0,3mmol/l; Glukose 5,5mmol/l; Insulin 5IU/l. Diese Perfusatlösung wurde vor der Perfusion der Herzen bei 37°C mit einem Gasgemisch, bestehend aus 94,4% O₂ und 5,6% CO₂ äquilibriert, dabei stellte sich ein pH von 7,40 – 7,45 ein.

Zur Organentnahme wurden die Tiere durch einen Nackenschlag betäubt, anschließend wurde durch die beidseitige Durchtrennung der Aa. carotides eine teilweise Entblutung durchgeführt. Danach erfolgte die zügige Eröffnung des Thorax und Herbeiführung einer Kardioplegie durch Spülung mit 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung. Lungen und Perikard wurden vorsichtig entfernt, die Aorta mit einem Faden unterfahren und dann mit einem queren Schnitt eröffnet. Anschließend wurde in das Gefäß eine Stahlkanüle (Innendurchmesser 1.5-2.0mm) eingeführt und wenige Millimeter oberhalb des Abgangs der Koronararterien eingebunden. So konnte ca. 30-60 Sekunden nach der Eröffnung des Thorax eine retrograde Perfusion der Koronargefäße über die Aorta begonnen werden. Nun wurden unter Wahrung der Gefäßansätze die Aorta distal der Kanüle, die A. Pulmonalis und die Venae azygos, cava superior und inferior durchtrennt. Das Herz war nun komplett aus dem Thorax zu lösen und in die Perfusionsanlage einzubringen.

Die Herzen wurden druckkonstant (80cm H₂O) nach Langendorff retrograd über die Aorta perfundiert. Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau der Perfusionsanlage.

Die Vv. cavae, Vv. pulmonales und V. azygos wurden ligiert und, zur Entnahme koronarvenösen Effluats aus dem Sinus coronarius, in die A. pulmonalis eine Stahlkanüle eingebunden. Über diese Kanüle wurde mittels eines Flussmesskopfes per Duplexsonographie der Koronarfluss kontinuierlich bestimmt. Es fand keine Rezirkulation des Effluats statt. Aus dem koronarvenösen Effluat



konnten jederzeit Proben entnommen werden. Mit Hilfe des auf der epikardialen Oberfläche entstehenden sogenannten Transsudats, einem Gemisch aus lymphatischer und interstitieller Flüssigkeit, läßt sich direkt die Nettofiltration des intakten Koronarbettes quantifizieren (Kupatt et al. 1997, Wienen et al. 1994). Die Menge der Transsudatbildung wurde nach zeitlich determinierter Abnahme an der Herzspitze mit Hilfe einer Präzisionswaage bestimmt. Zur Applikation der Infusionslösungen (Albumin bzw. HES-Kolloide) wurde in die Aortenkanüle ein kleiner Katheter eingebracht, der mit einer Infusionspumpe verbunden war. Zur Applikation von Heparinase oder Nitro-L-Arginin wurden weitere Katheter in die Aortenkanüle eingeführt, die ebenfalls über eine Infusionspumpe beschickt wurden. Eine myokardiale Ischämie konnte durch Umlegen eines Dreiwegehahns erreicht werden (siehe Abbildung 2). Die Herzen wurden durch einen, mit 37°C warmem Wasser, durchspülten Glaszylinder, in welchem das Herz hing, erwärmt. Jede Versuchsgruppe beinhaltete mindestens fünf einzelne Versuche.

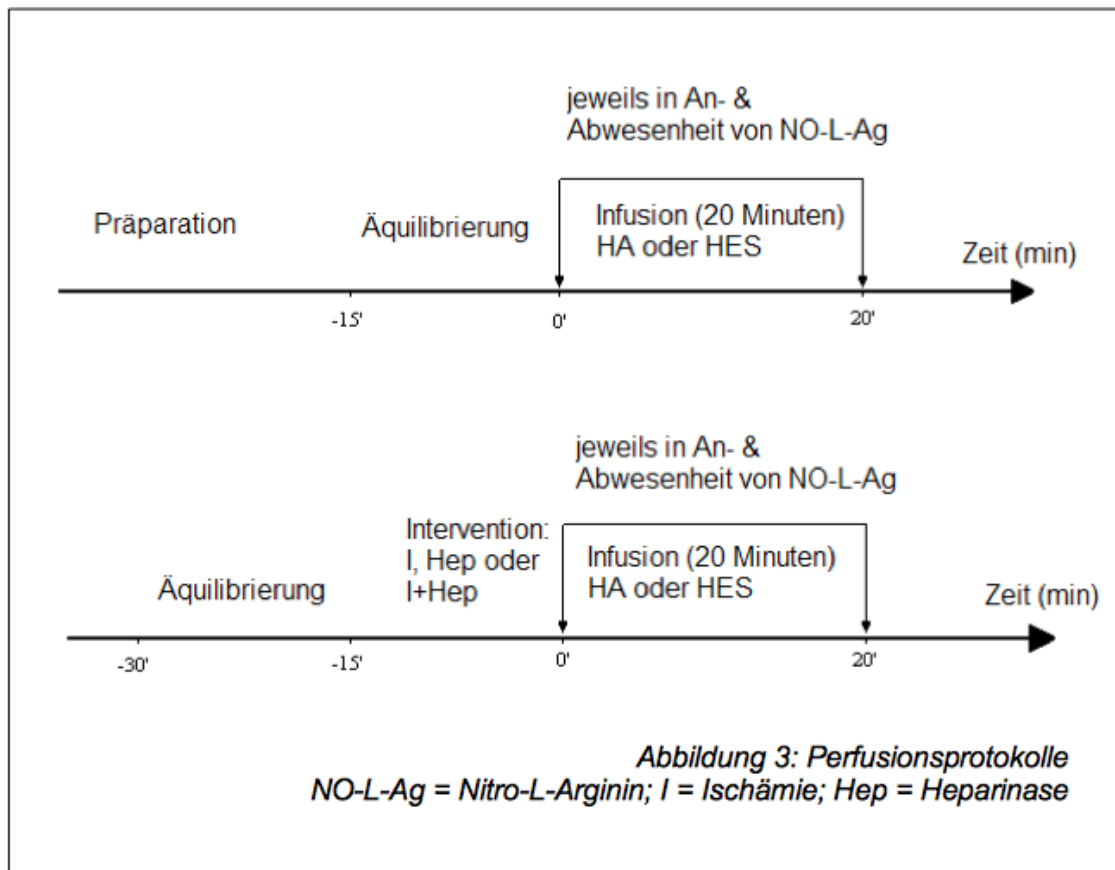
Ausschlusskriterien für die Verwendung eines Herzpräparates waren

- primäre hohe Transsudatformation, welche auf eine Undichtigkeit des Gefäßsystems schließen ließ
- persistierende schwere Herzrhythmusstörungen
- Pumpversagen mit massiver Blähung des rechten Atriums (Rückstau des Koronareffluats aus dem Sinus coronarius)

2.3 Versuchsprotokolle

In der ersten Versuchsserie wurden verschiedene Infusionslösungen auf ihre Einflußnahme auf Herzzeitvolumen und Transsudatbildung untersucht. Nach einem Intervall von 15 min zur Äquilibration wurden die Herzen mit 5% Humanalbumin (HA) oder HES 6% MW450kD infundiert, und zwar mit einer Rate, die 1/3 des gerade gemessenen Herzzeitvolumens entsprach. Transsudat und Koronareffluat wurden vor Beginn der Infusion (Wert 0 Minuten), sowie zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15 und 20 Minuten nach Infusionsbeginn gemessen. In jeweils einer der Gruppen von Herzen wurde gleichzeitig zum Kolloid NOLAg 10^{-5} M zur Inhibition der endothelialen NO-Synthase (eNOS) über einen kleinen Katheter oberhalb der Aortenkanüle zugeführt.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden der Applikation der Infusionslösungen verschiedene Interventionen vorausgeschickt. Diese waren zum Einen die Applikation von 10 IU Heparinase in 1ml NaCl 0,9% über eine Dauer von 15min (*Intervention Hep*), zur Denaturierung der Glykokalyx. Ein weiteres Protokoll sah eine warme Ischämie (35-37 °C) von 15min Dauer (*Intervention I*) oder aber die Infusion von 10 IU Heparinase während gleichzeitiger warmer Ischämie (*Intervention I+Hep*) vor. Direkt nach der jeweiligen Intervention begann die Kolloidinfusion (mit oder ohne NOLAg 10^{-5} M) über 20min mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 1/3 des aktuellen Koronarflusses. Effluat und Transsudat wurden wiederum vor der Infusion sowie zu den Zeitpunkten 1,2,3,4,6,8,10,15 und 20min nach Infusionsbeginn gesammelt. Die Perfusionsprotokolle dauerten jeweils maximal 50min (siehe Abbildung 3).



2.4 Bildgebung mittels Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Darstellung der endothelialen Glykokalyx wurde nach einer von Vogel et al. beschriebenen Fixierungsmethode durchgeführt. (Vogel et al. 2000). Die Herzen wurden nach Ende eines Perfusionsprotokolls (Humanalbumin oder HES ohne Intervention, nach 15 Minuten warmer Ischämie oder nach Applikation von 10 IU Heparinase) über die Aorta mit Fixationslösung perfundiert. Die Fixationslösung setzte sich aus 2% Glutaraldehyd, 2% Saccharose, 0,1M Natriumcacodylat und 2% Lanthan(III)nitrat zusammen. Die Flussrate dieser Lösung betrug 3 ml/min. Nach Ende der Herzmuskelkontraktionen, welches üblicherweise eine Minute nach Beginn der Infusion der Fixierungslösung eintrat, wurde die Wand des linken Ventrikels in ca. 1mm³ kleine Stücke geteilt. Diese Stücke wurden dann für zwei Stunden bei 20°C in der Fixierungslösung aufbewahrt. Im Anschluss wurden die Ventrikelstücke für weitere zwölf Stunden bei 20°C in einer Lösung aus 2% H₂O₂, 2% Saccharose, 0,1 M Natriumcacodylat und 2% Lanthan(III)nitrat weiter inkubiert. Danach wurden die Myokardpräparate mit einer Lösung aus H₂O, 0,1M NaOH und 12%iger Saccharose im Mischverhältnis 3:2:1 gewaschen. Zuletzt wurde eine Kontrastierung mit einer Lösung aus 2% Osmiumtetroxid und 2% Lanthannitrat in destilliertem Wasser vorgenommen. Die bildliche Darstellung der Glykokalyx wurden in der Anatomischen Anstalt der LMU München (Lehrstuhl Prof. U. Welsch) mit einem Elektronenmikroskop durchgeführt.

Das polyvalente Kation Lanthan (La³⁺) fungierte bei dieser Fixierung als Tracer für die Elektronenmikroskopie. Es bindet an negativ geladene Bestandteile der endothelialen Glykokalyx (Heparan- und Chondroitinsulphat); die Glykokalyx wird somit schon während der Fixierung stabilisiert. Nicht entfaltete Gefäße wurden in der Untersuchung nicht berücksichtigt, da sie mutmaßlich nicht ausreichend mit Fixierlösung perfundiert worden sind.

2.5 Statistische Auswertung

Bei den Untersuchungen an isolierten Meerschweinchenherzen wurden zum Vergleich normalverteilter Daten Student t-Tests oder, bei multiplen Vergleichen, Varianzanalysen (ANOVA) mit robusten Standardfehlern (Huber/White/Sandwich estimator) durchgeführt. Da die Daten überwiegend normalverteilt waren, werden sie im Folgenden als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen verschiedener Kolloide und Adjuvantien auf den Tonus sowie auf die Permeabilität der Gefäße am intakten Koronarsystem isolierter Herzpräparate von Meerschweinchen untersucht.

3.1 Kolloide ohne Intervention

In einer ersten Serie von Experimenten wurden die Kolloide HES (MW 450.000 kd) und Albumin eingesetzt. Bei der Infusion von HES 450 stieg der Koronarfluss auf 117% ($p=0,21$) des Ausgangswertes an (Zeitpunkt 0 min, Abb. 3), unter Albumininfusion sogar auf 229% (Abb. 4.1); nur der Anstieg unter Albumin war statistisch signifikant ($p<0,01$). Gleichzeitig sank die Extravasation von Perfusionslösung (Transsudatbildung) unter Hydroxyethylstärke im Verhältnis zum Koronarfluß von einem Ausgangswert von 4,40% auf 3,94% ($p<0,01$). Absolut stieg die Transsudatbildung auf 105% des Basalwertes an (nicht signifikant), unter Albumin sank das Verhältnis Coronareffluat zu Transsudat von 3,30% auf 1,98% ($p<0,05$). In absoluten Zahlen war dies ein Anstieg auf 129% (nicht signifikant) (vgl. Abb. 4.2 und 4.3).

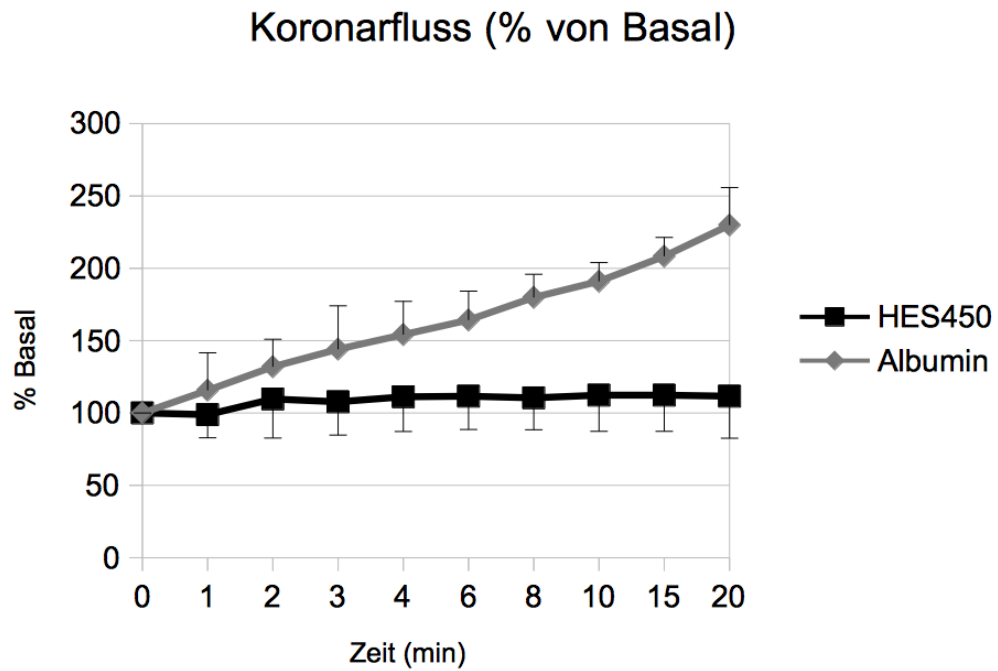


Abbildung 4.1: Koronarfluss ohne Intervention
($MW \pm SEM$; $n \text{ HES} = 5$, $n \text{ HA} = 5$)

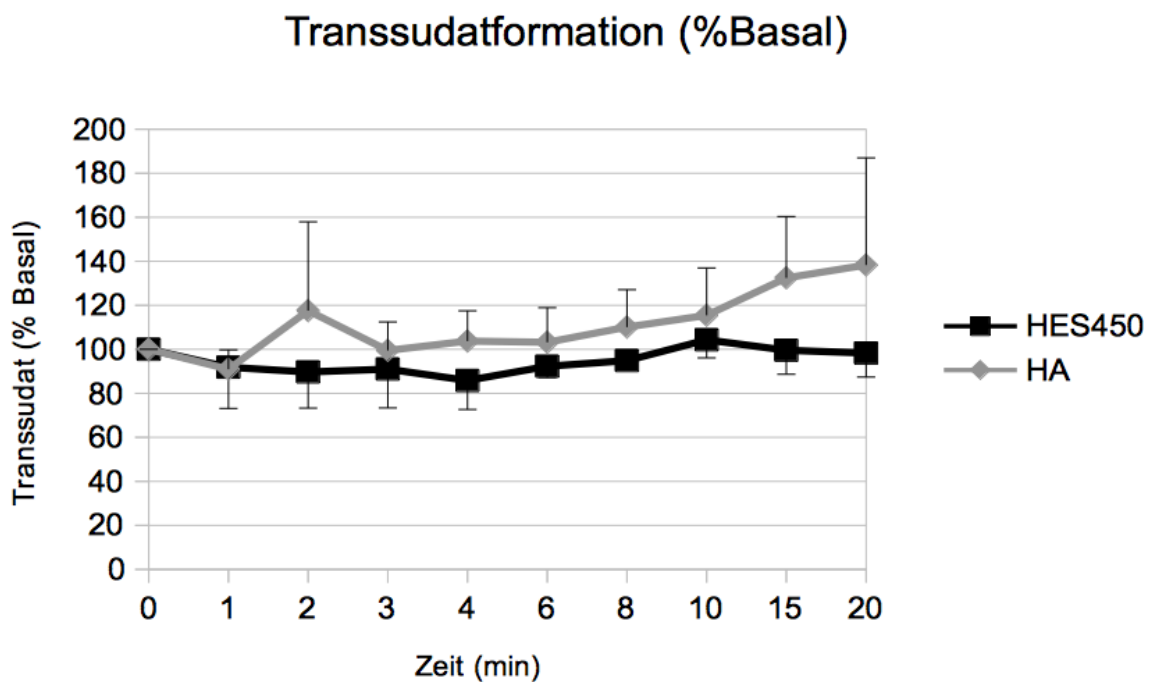


Abbildung 4.2: Transsudatbildung (% vom Basalwert) ohne Intervention
($MW \pm SEM$; $n \text{ HES} = 5$, $n \text{ HA} = 5$)

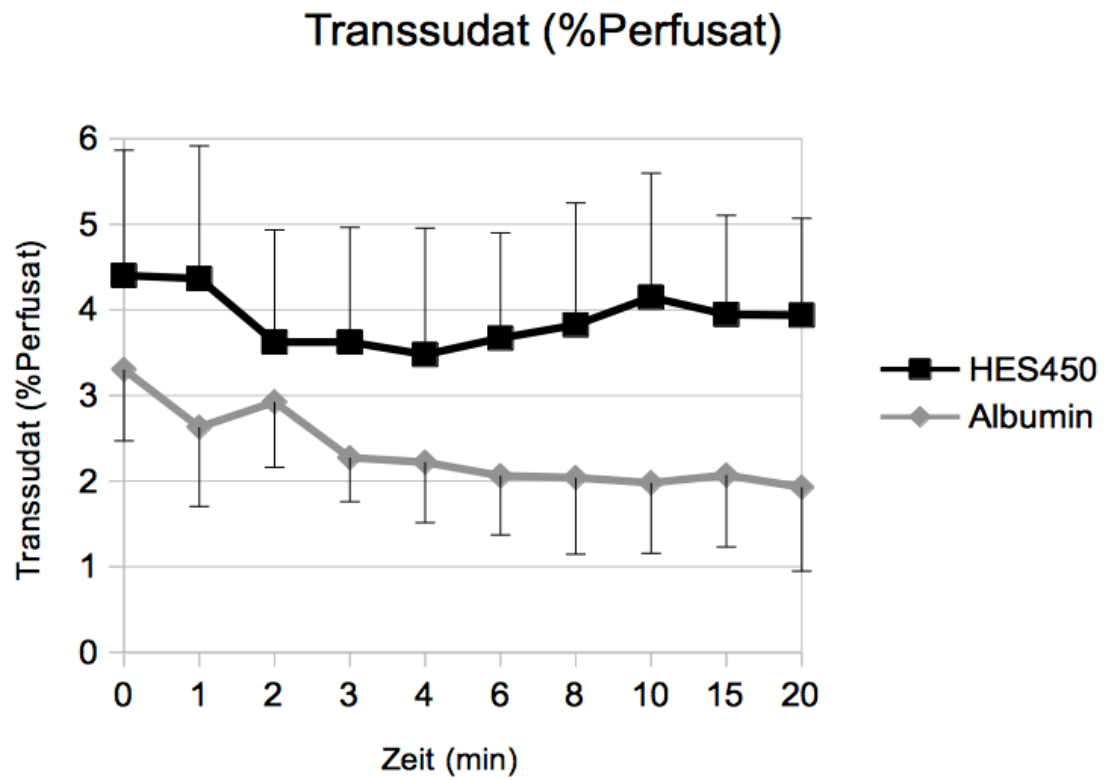


Abbildung 4.3: Transsudatbildung (% vom Koronarfluss) ohne Intervention
($MW \pm SEM$; $n_{HES} = 5$, $n_{HA} = 5$)

3.2 Kolloide nach Heparinase

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Herzen nach der Äquilibrationsphase über 10 min mit Heparinase vorbehandelt, um die endotheliale Glykokalyx abzutragen. Dabei stieg der Koronarfluss auf 110% des Ausgangswertes in der HES 450 Gruppe und auf 130% in der Gruppe mit Humanalbumin als Perfusatzusatz (keine Signifikanz im Vergleich zum Ausgangswert oder HES verglichen mit HA) (Abb. 5.1). Die Transsudatbildung in Abhängigkeit vom Basalwert stieg im HES-Kollektiv auf 118% des Ausgangswertes (nicht signifikant), in der Vergleichsgruppe mit Albumin-Infusion jedoch kam es zu einem Abfall der Transsudatformation auf 53,5% des Ausgangswertes ($p < 0,01$). Betrachtet man das Transsudat/Perfusat-verhältnis, sank dies in der Albumingruppe von 2,82% auf 1,27% ($p < 0,01$), im HES-450-Kollektiv kam es dagegen zu einem Anstieg von 4,00% auf 4,45% (nicht signifikant). Im Vergleich Humanalbumin gegen HES ließen sich sowohl im Verhältnis Transsudat-Perfusat ($p < 0,05$) als auch Transsudat(%Basal) ($p < 0,01$) ein signifikanter Unterschied nachweisen.

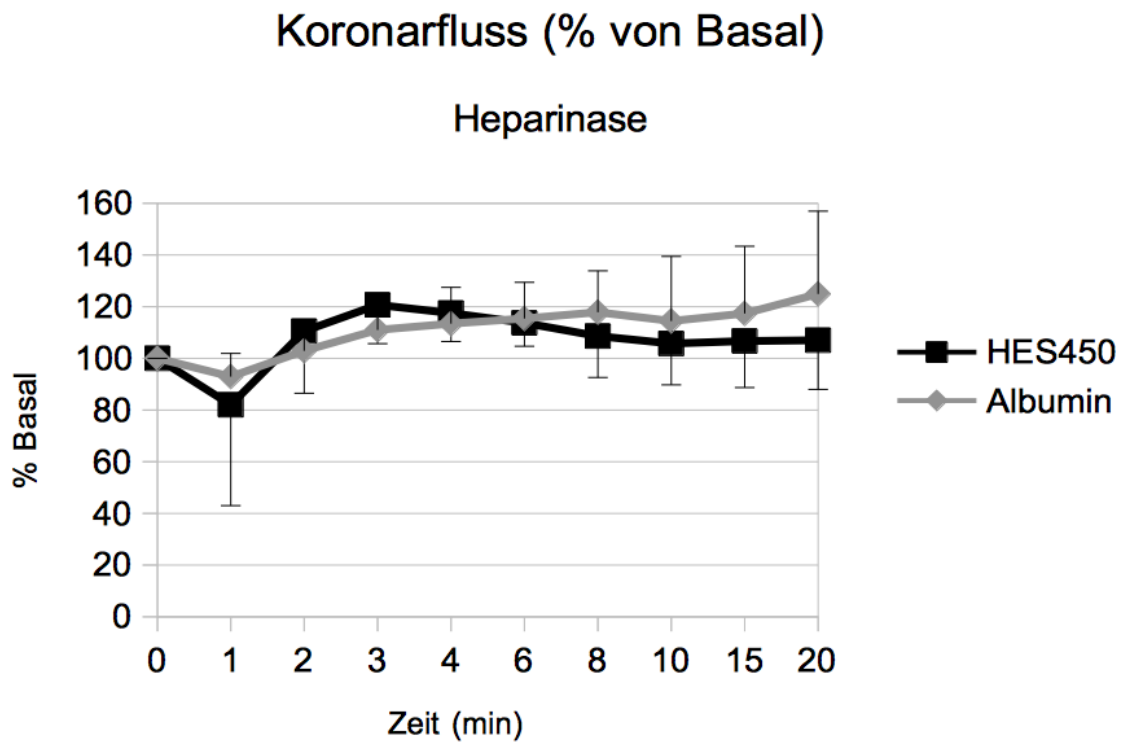


Abbildung 5.1: Koronarfluss (% vom Basalwert) nach Heparinaseinfusion
($MW \pm SEM$; $n_{HES} = 5$, $n_{HA} = 5$)

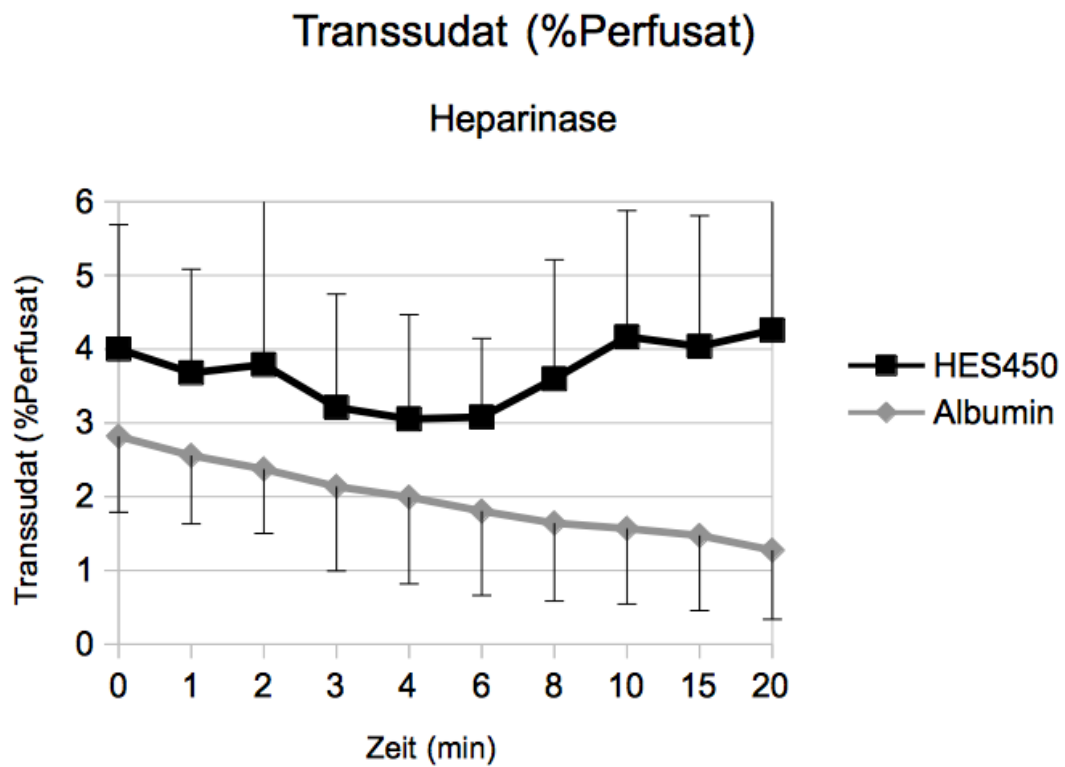
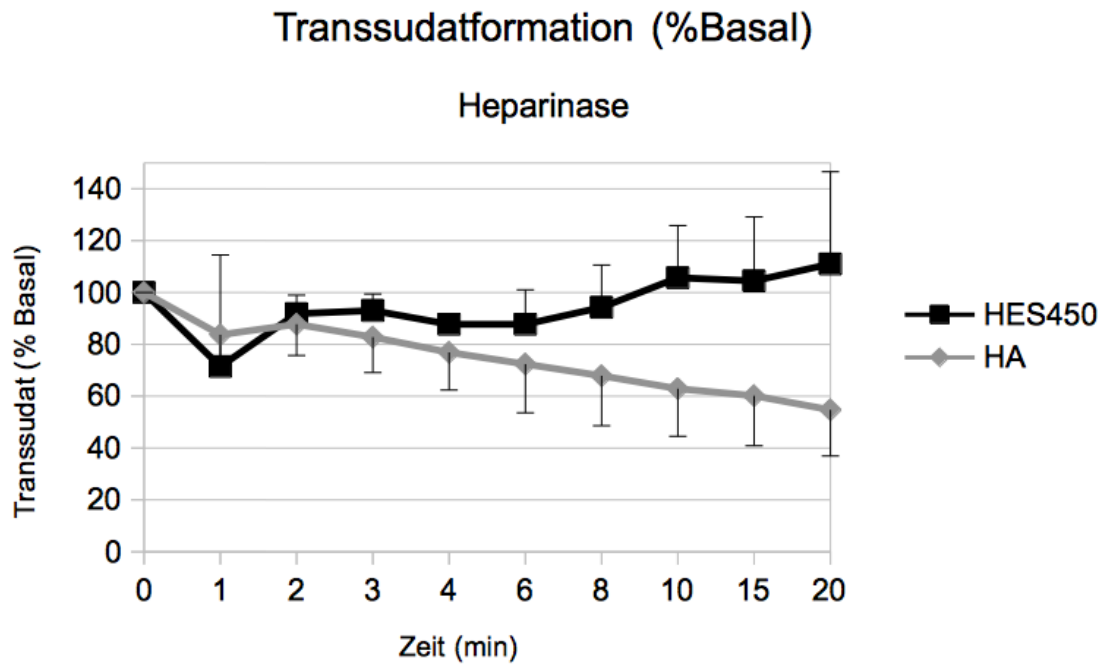


Abbildung 5.2: Transsudatbildung (% vom Basalwert) nach Heparinaseinfusion
($MW \pm SEM$; $n_{HES} = 5$, $n_{HA} = 5$)



*Abbildung 5.3: Transsudatbildung (% vom Koronarfluss) nach Heparinaseinfusion
(MW \pm SEM; n HES = 5, n HA = 5)*

3.3 Kolloide mit Nitro-L-Arginin

Als nächstes wurden Herzen unter Zusatz von Nitro-L-Arginin (NOLAg) in einer konstanten Konzentration von 10^{-5}M zusammen mit jeweils einem der beiden Kolloide perfundiert.

In dieser Versuchsgruppe stieg der Koronarfluß bei Verwendung von Humanalbumin auf 150% des Ausgangswertes ($p<0,01$), fiel jedoch bei Verwendung von HES 450 auf 82% ab ($p<0,05$). Dies bedeutete eine deutliche Abnahme des Koronarflusses in beiden Gruppen im Vergleich zu den Experimenten ohne NoLAg (Abb. 6.1). Dieser war jedoch lediglich im Fall von Humanalbumin signifikant ($p<0,01$).

Die Transsudatbildung sank dabei auf 59% des Ausgangswertes in der Humanalbumingruppe ($p<0,01$), und auf 62% in der Gruppe mit HES 450 ($p<0,01$) (Abb. 6.2).

Es ließ sich eine Abdichtung des Endothels gegenüber den Protokollen ohne Inhibition der NO-Synthese nachweisen; diese war statistisch signifikant ($p<0,01$). Im Verhältnis zum Koronarfluß sank die Transsudatbildung von 3,72% auf 1,46% in der Albumingruppe und von 2,57% auf 2,09% im HES 450-Kollektiv; hier war lediglich die Wirkung von Albumin signifikant ($p<0,05$), HES oder der Vergleich HES gegen Albumin hatten keine Signifikanz.

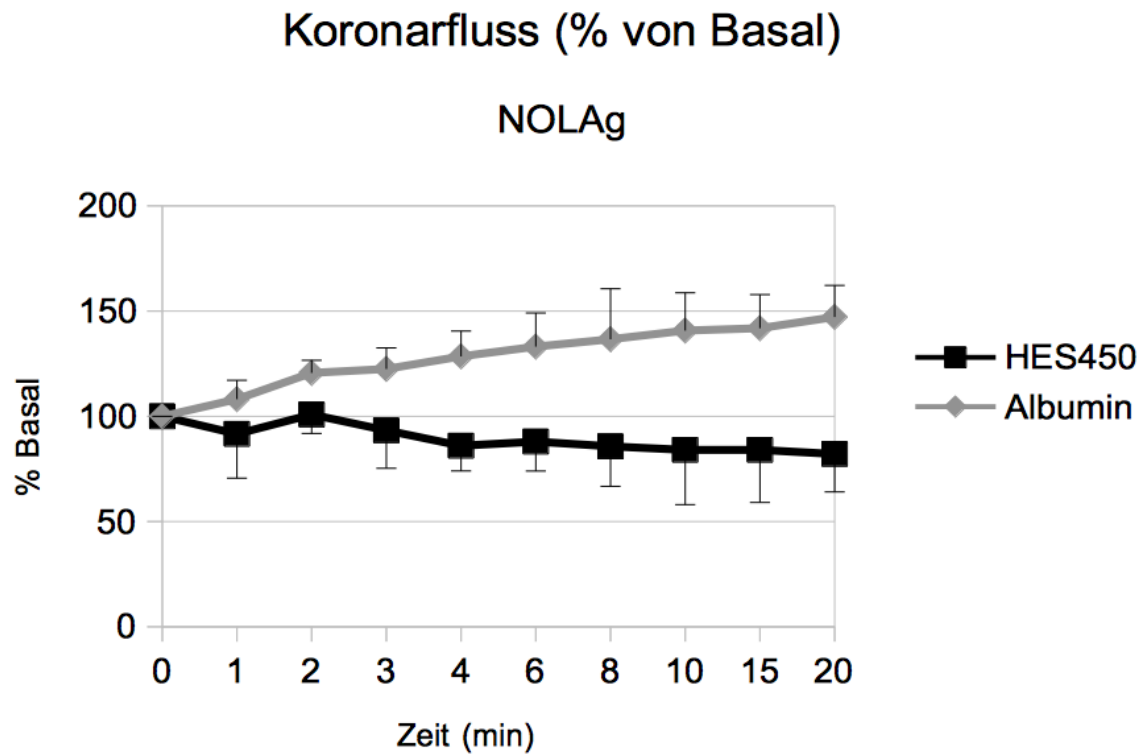


Abbildung 6.1: Koronarfluss (% von Basal) unter Infusion von NO-L-Ag
(MW \pm SEM; n HES = 5, n HA = 7)

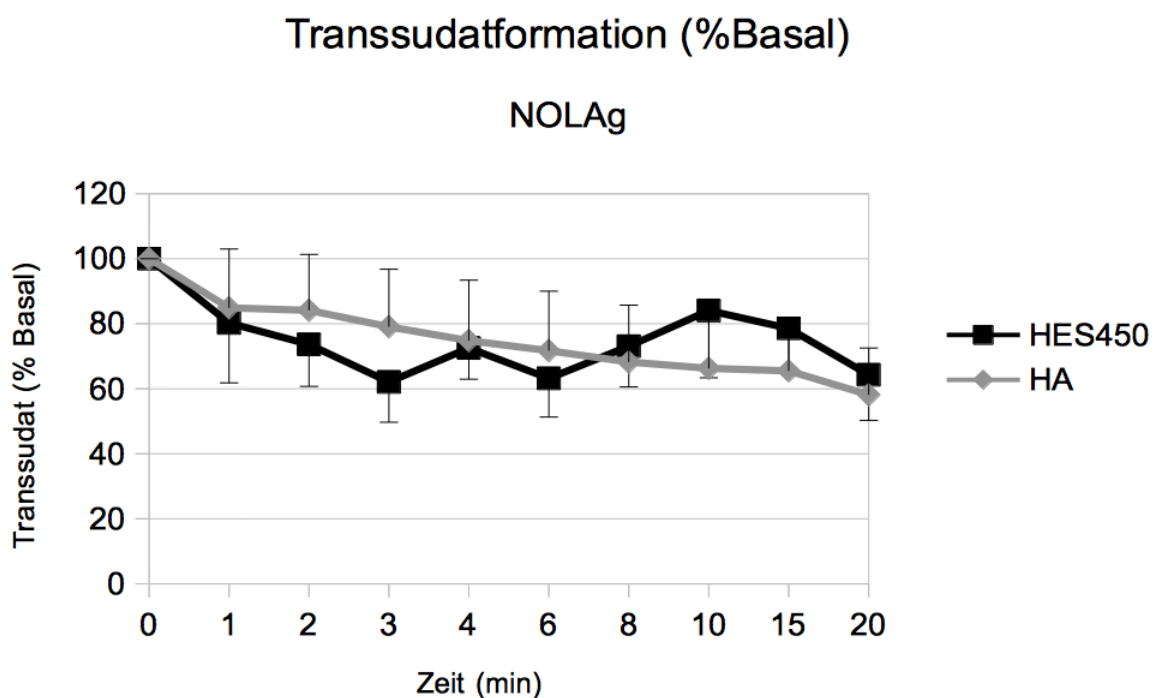
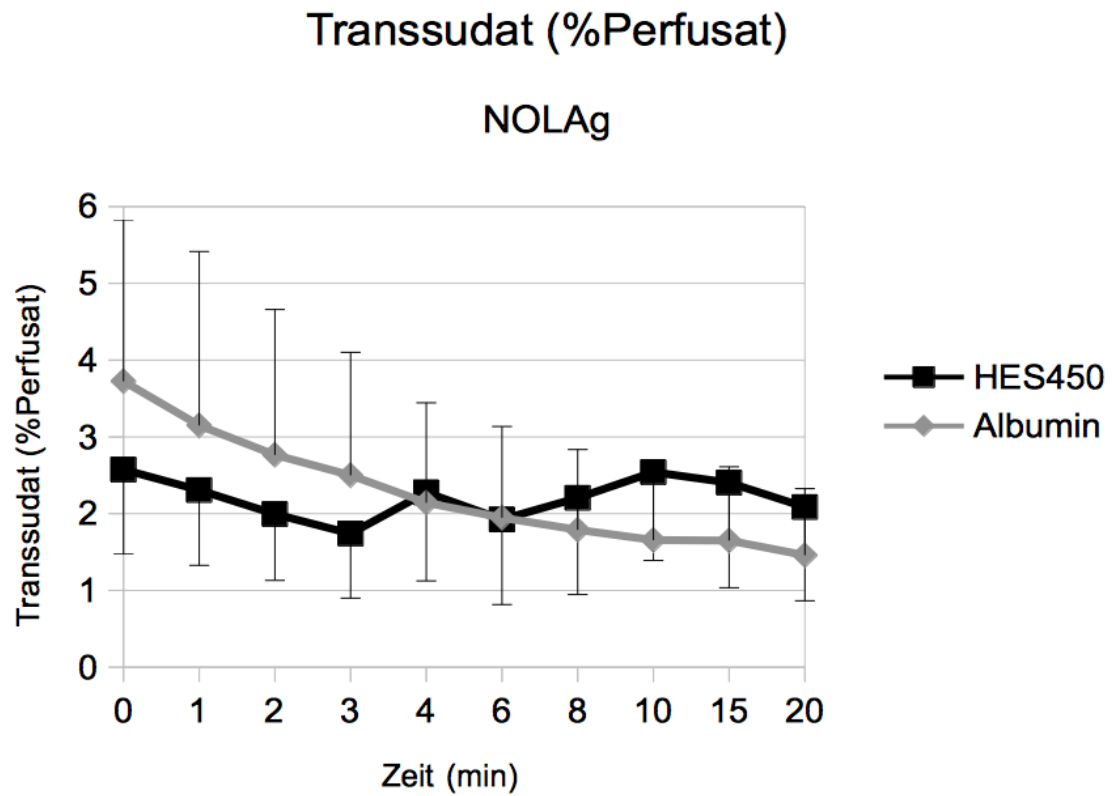


Abbildung 6.2: Transsudatbildung (% vom Basalwert) unter Infusion von NO-L-Ag
(MW \pm SEM; n HES = 5, n HA = 7)



*Abbildung 6.3: Transsudatbildung (% vom Coronarfluss) unter Infusion von NO-L-Ag
(MW \pm SEM; n HES = 5, n HA = 7)*

3.4 Kolloide mit Heparinase und NOLAg-Infusion

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Herzen vor der Perfusion mit HES/Albumin und NOLAg zuvor mit Heparinase behandelt, um die endotheliale Glykokalyx abzutragen, und damit eine, durch die Glykokalyx vermittelte, schubspannungsassoziierte NO-bedingte Signalübertragung zu unterbinden. Hierbei ergab sich eine Steigerung des Koronarflusses in der Albumingruppe auf 123%. Im HES 450-Kollektiv sank der koronare Fluß auf 87% des Ausgangswertes ab; dies war im direkten Vergleich der beiden Gruppen signifikant ($p < 0,01$). Die Änderung des Koronarflusses im Vergleich zur Versuchsreihe mit NOLAG-Infusion allein war nicht signifikant. Dies bedeutet, dass durch die Abtragung der Glykokalyx in Verbindung mit NOLAg der Koronarfluss, im Vergleich zur Versuchsgruppe mit NOLAg-Infusion allein, keine Änderung erfuhr (vgl. Abb. 6.1 und 7.1).

Die Bildung von Transsudat fiel in dieser Versuchsserie in der Albumingruppe auf 50,3% des Ausgangswertes ab ($p < 0,01$), im HES-Kollektiv zeigte sich ein (nicht signifikanter) Abfall auf 87% (Abb. 7.2), der Unterschied zwischen diesen beiden Versuchsarmen war ebenfalls signifikant ($p < 0,05$). Im Bezug zum Koronarfluß sank die Transudatbildung unter Albumin von 3,74 auf 1,45% ($p < 0,01$), in der HES-Gruppe von 3,5 auf 3,35% (nicht signifikant) (Abb. 7.3). Im Vergleich der beiden Versuchsarne HES gegen HA bestand hier ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$). In diesem Protokoll ließ sich kein additiver Effekt der Abtragung der Glykokalyx im Vergleich zur alleinigen Inhibition der NO-Synthese darstellen.

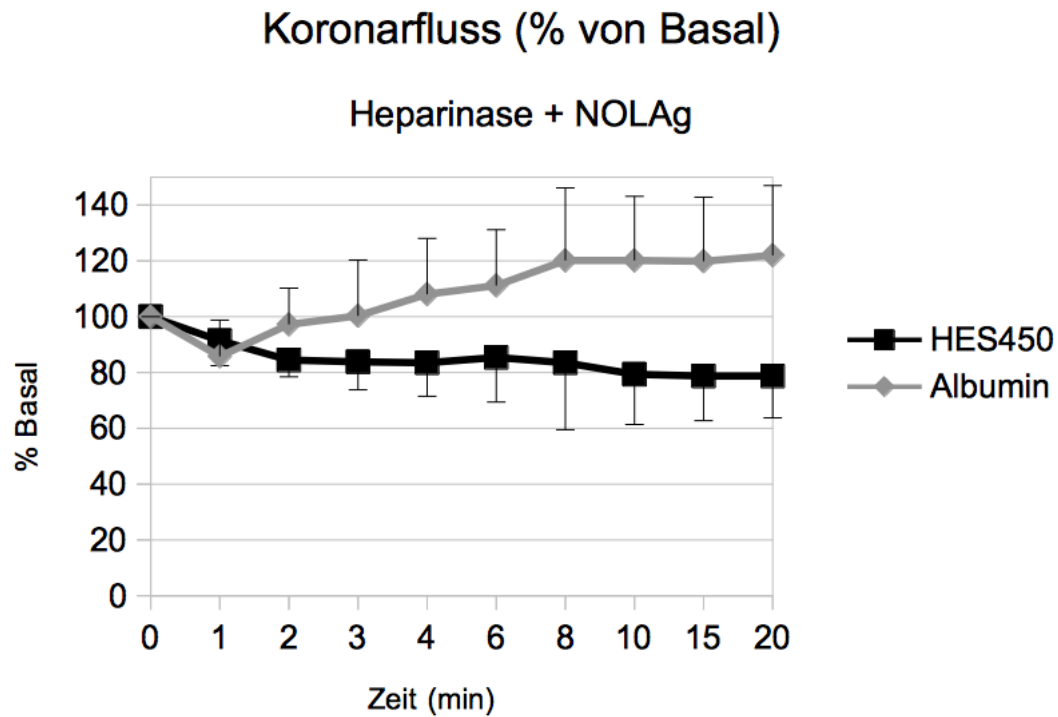


Abbildung 7.1: Koronarfluss (% vom Basalwert)
nach Applikation von Heparinase unter NO-L-Ag-Infusion
(MW \pm SEM; n HES = 10, n HA = 5)

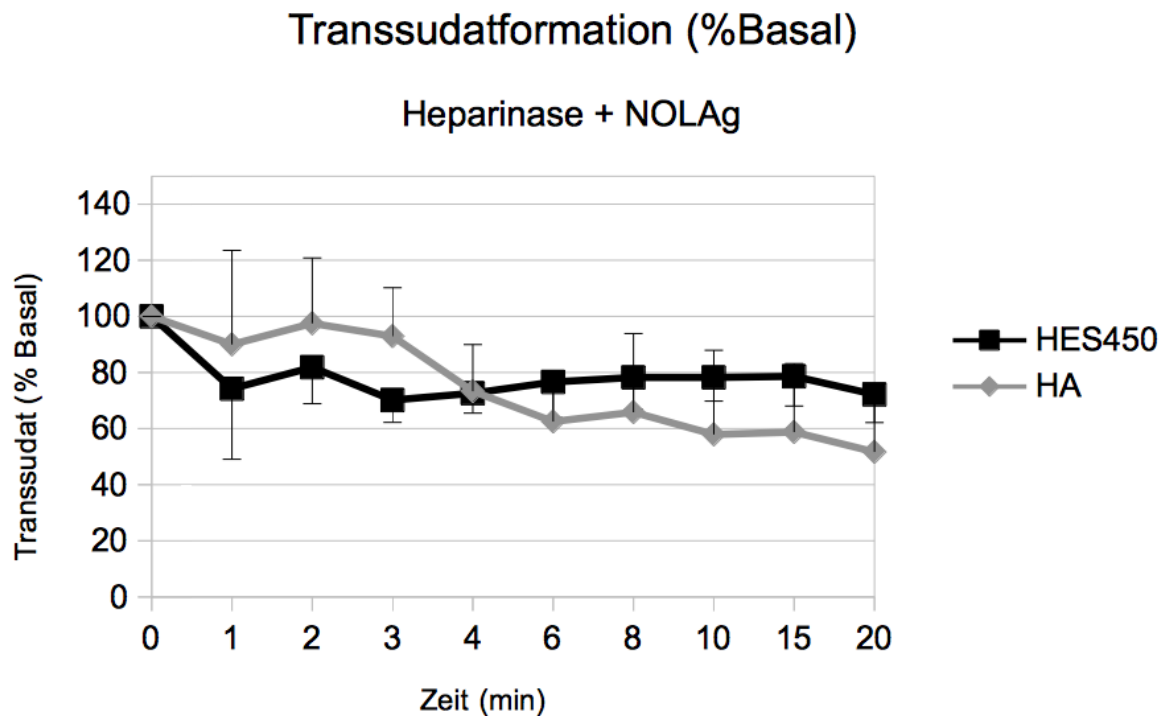


Abbildung 7.2: Transsudatbildung (% vom Basalwert)
nach Applikation von Heparinase unter Infusion von NO-L-Ag
(MW \pm SEM; n HES = 10, n HA = 5)

Transsudat (%Perfusat)

Heparinase + NO-LAg

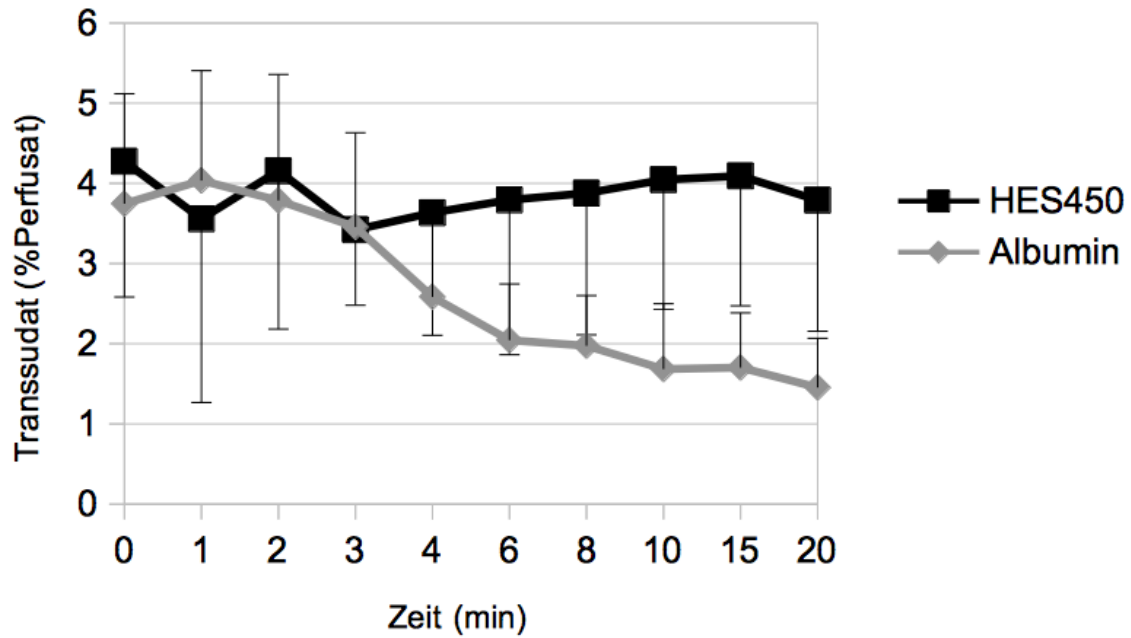


Abbildung 7.3: Transsudatbildung (% vom Koronarfluss)
nach Applikation von Heparinase unter Infusion von NO-L-Ag
($MW \pm SEM$; $n_{HES} = 10$, $n_{HA} = 5$)

3.5 Kolloide nach Ischämie

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Kolloidinfusion eine 15minütige warme Ischämie vorausgeschickt. Es wurde also vorrangig das Endothel selbst geschädigt, die Glykokalyx jedoch relativ „unberührt“ gelassen. In der Humanalbumingruppe stieg der Koronarfluss auf 253% des Ausgangswertes an ($p<0,01$), die Transsudatbildung stieg gleichzeitig auf 180% des Ausgangswertes an ($p<0,01$); das Transsudat/Perfusat-Verhältnis fiel (nicht signifikant) von 3,36% auf 2,45% ab. In der Vergleichsgruppe HES450 stieg der Koronarfluss nur moderat auf 118% des Ausgangswertes an, die Transsudatformation ebenfalls nur moderat auf 129% (jeweils nicht signifikant). Das Verhältnis von Transsudat zu Perfusat blieb mit 2,95% bzw. 3,01% in beiden Gruppen virtuell unverändert (Abb. 8.1-8.3). Im direkten Vergleich HES gegen Albumin war nur der Unterschied in der Entwicklung des Koronarflusses signifikant ($p<0,01$); im direkten Vergleich der einzelnen Transsudat-Verhältnisse ergab sich keine signifikante Änderung zwischen den einzelnen Kolloiden.

Koronarfluss (% von Basal)

HES450/HA mit Ischämie

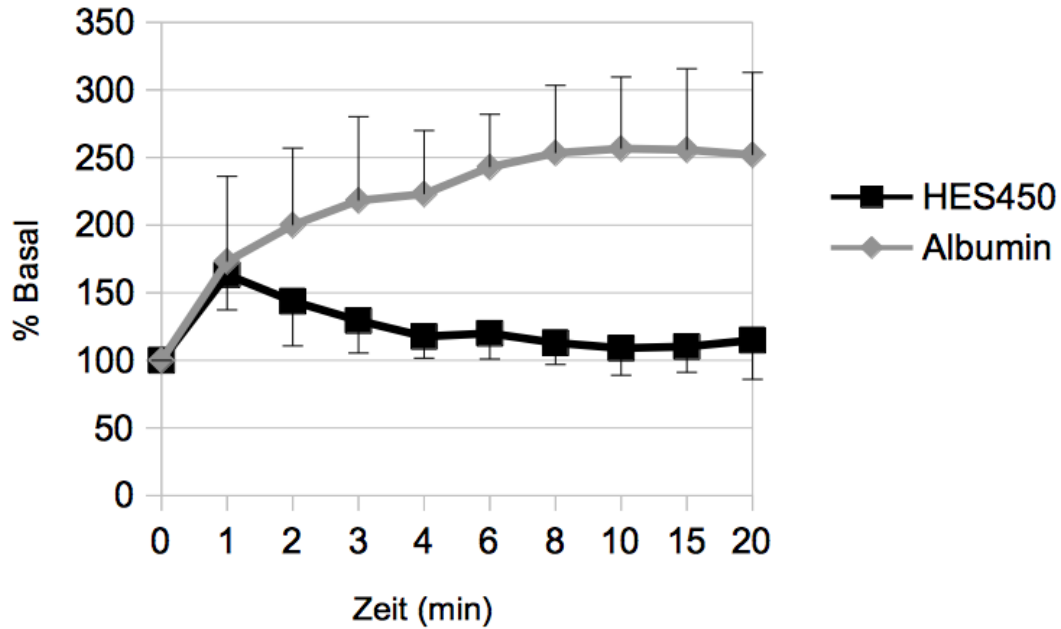


Abbildung 8.1: Koronarfluss (% vom Basalfluss) nach Ischämie
($MW \pm SEM$; $n_{HES} = 5$, $n_{HA} = 7$)

Transsudatformation (%Basal)

HES450/HA mit Ischämie

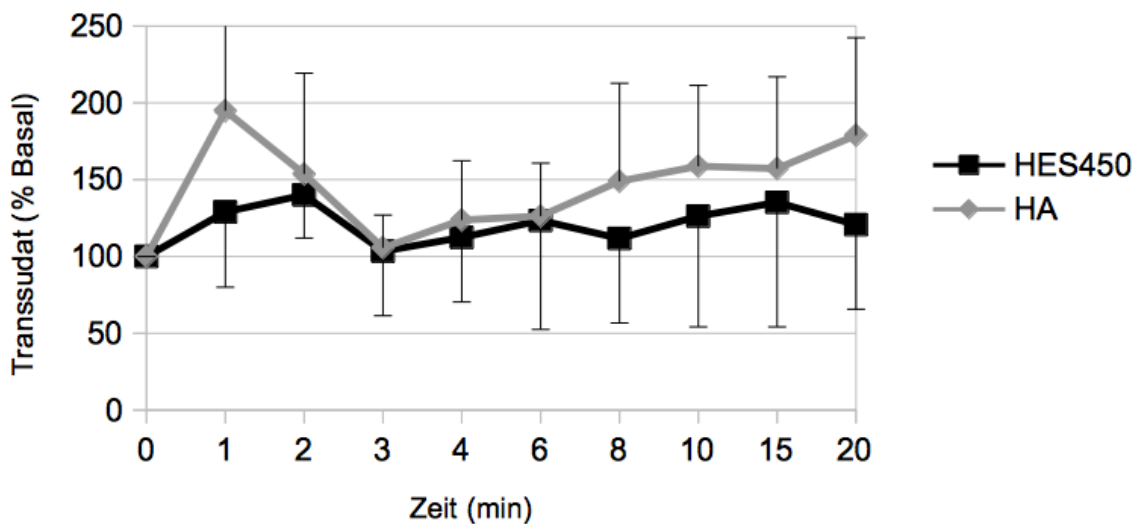


Abbildung 8.2: Transsudatbildung (% vom Basalwert) nach Ischämie
($MW \pm SEM$; $n_{HES} = 5$, $n_{HA} = 7$)

Transsudat (%Perfusat)

HES450/HA mit Ischämie

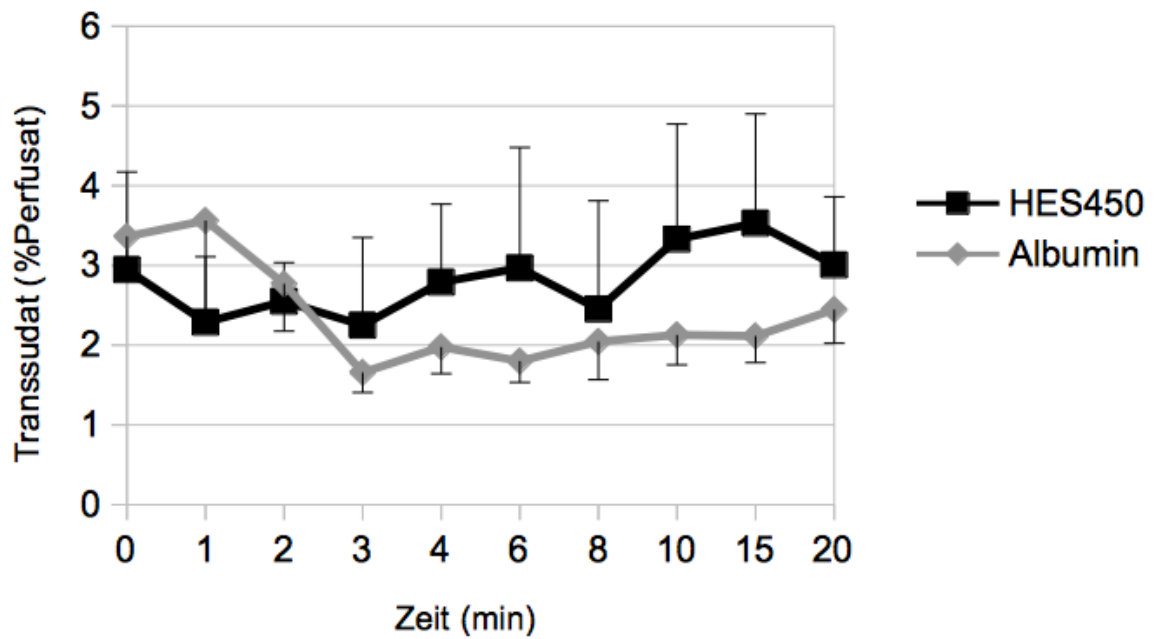


Abbildung 8.3: Transsudatbildung (% vom Koronarfluss) nach Ischämie
($MW \pm SEM$; $n \text{ HES} = 5$, $n \text{ HA} = 7$)

3.6 Kolloide nach Ischämie und Heparinase

Zuletzt wurde nun die Auswirkung einer warmen Ischämie in Kombination mit einer Heparinasebehandlung untersucht. In der HES450-Gruppe kam es zu einem leichten (nicht signifikanten) Anstieg des Koronarflusses auf 114% des Ausgangswertes die Transsudatbildung stieg auf 140% an. Dies bedeutete einen moderaten Anstieg von 3,24% auf 3,97% des Perfusatstromes; auch die Veränderung des Transsudatflusses war nicht signifikant. (Abb. 9.3). In der Humanalbumin-Gruppe kam es zu einem starken Anstieg des Koronarflusses auf 263% des Ausgangswertes ($p < 0.01$), die Transsudatformation stieg auf 187% des Basalwertes an. Dies bedeutete aber einen Abfall des Transsudat/Perfusatverhältnisses von 3,04% auf nur noch 2,03%; auch hier ergab sich bzgl. der Änderung des Transsudatflusses keine Signifikanz. (Abb. 9.3). Die Änderung des Koronarflusses in dieser Versuchsgruppe im direkten Vergleich Humanalbumin gegen HES war signifikant ($p < 0,01$).

Diese Experimente ergaben keine signifikante Abweichung von den Ergebnissen der Serie mit alleiniger Ischämie.

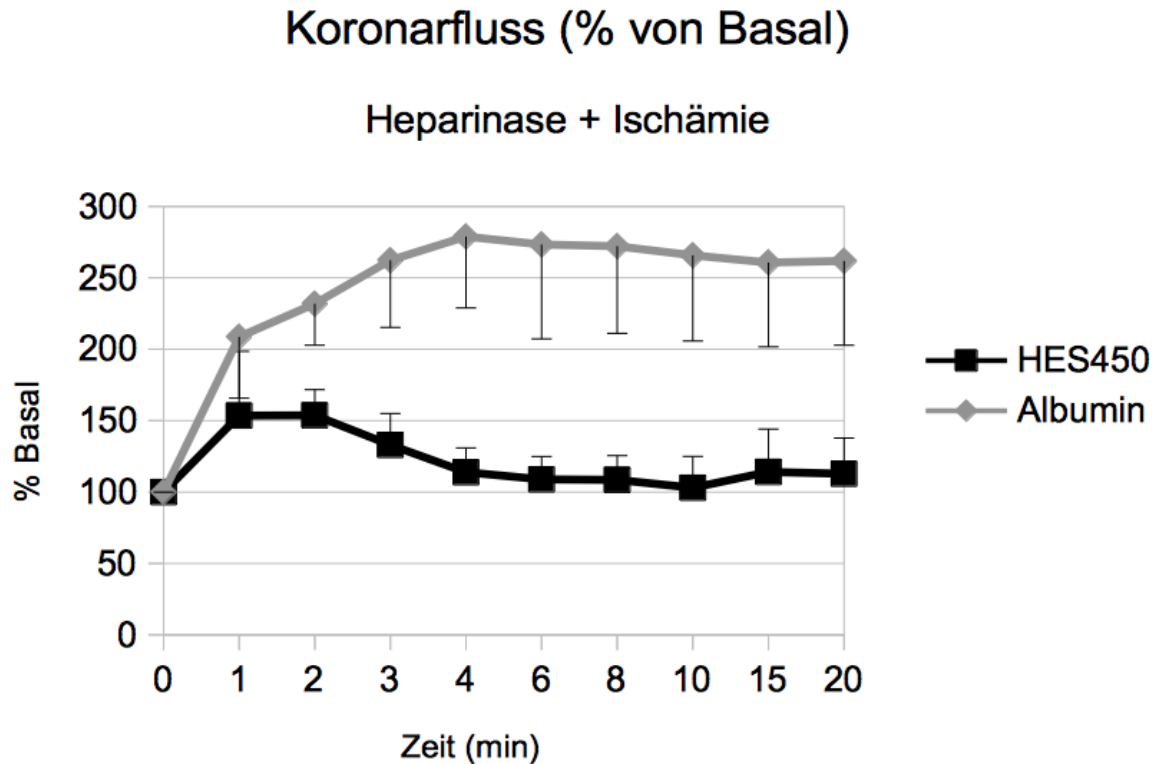


Abbildung 9.1: Koronarfluss (% vom Basalfluss)
nach Ischämie und Heparinaseapplikation
($MW \pm SEM$; $n_{HES} = 8$, $n_{HA} = 7$)

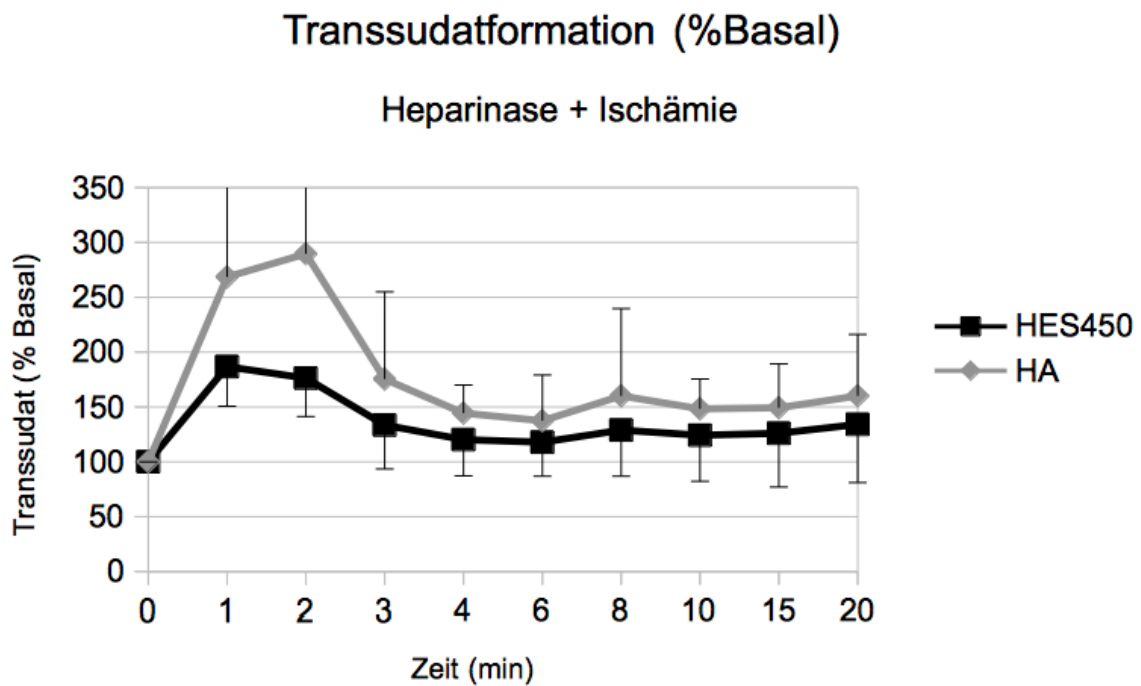
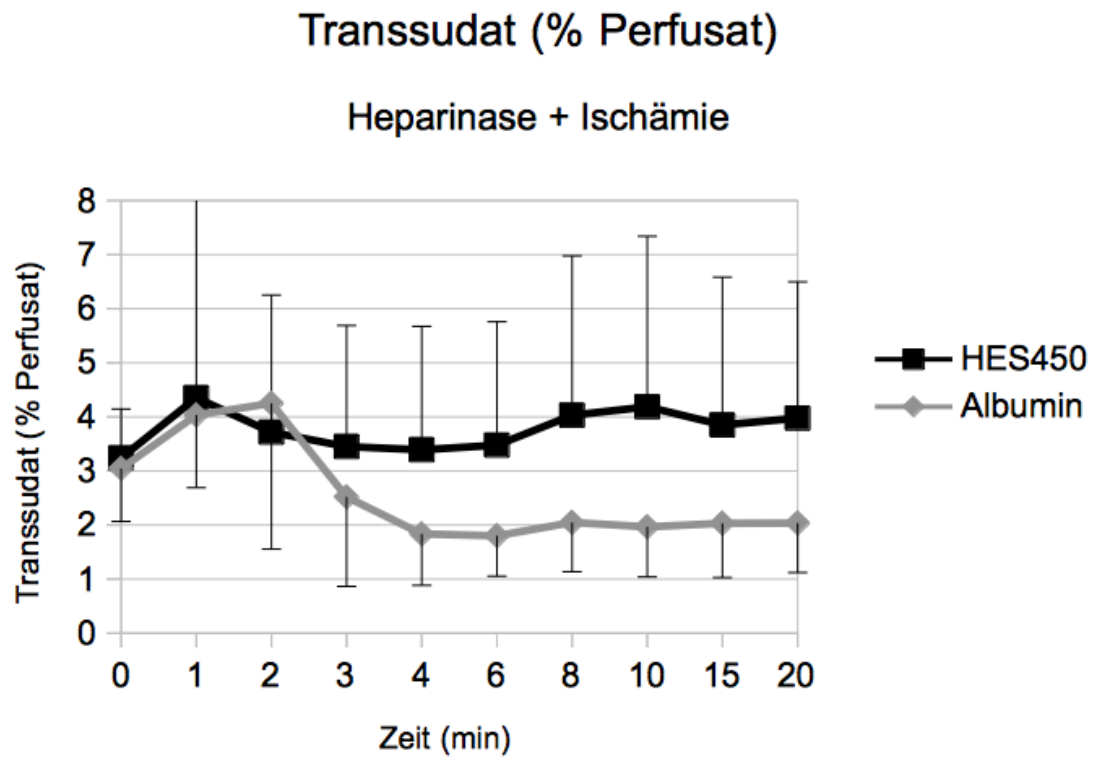


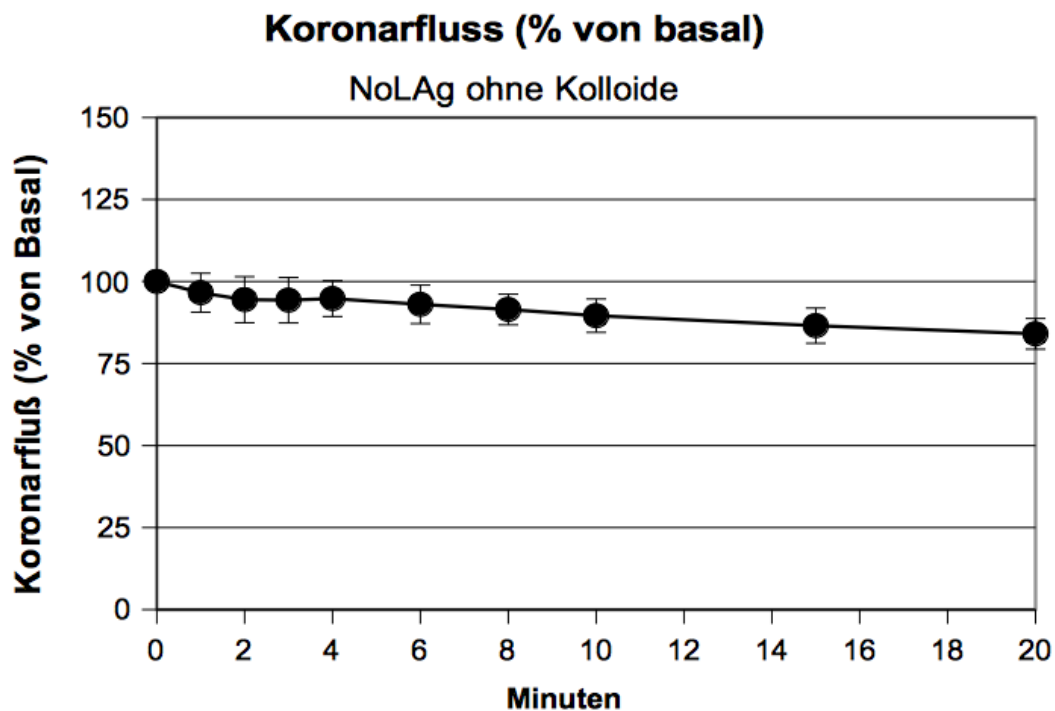
Abbildung 9.2: Transsudatbildung (% vom Basalwert)
nach Ischämie und Heparinaseapplikation
($MW \pm SEM$; $n_{HES} = 8$, $n_{HA} = 7$)



*Abbildung 9.3: Transsudatbildung (% vom Koronarfluss)
nach Ischämie und Heparinaseapplikation
(MW \pm SEM; n HES = 8, n HA = 7)*

3.7 NOLAg-Infusion ohne Zusatz von Kolloiden

Schließlich wurden in einer letzten Serie die Auswirkungen einer NOLAg-Infusion auf Koronarfluss sowie Transsudatformation in Abwesenheit von Kolloiden untersucht. In dieser Versuchsreihe ließ sich darstellen, daß es durch Applikation von NOLAg auch ohne Kolloide bereits zu einer Abnahme des Koronarflusses auf 84% vom Ausgangswert ($p < 0,01$) sowie zu einer entsprechenden Reduktion der Transsudatformation auf 86% des Basalwertes kam ($p < 0,01$); das Transsudat/Perfusat-Verhältnis blieb mit 3,5% unverändert.



*Abbildung 10.1: Koronarfluss (% vom Basalfluss)
unter NOLAg-Infusion ohne Kolloid-Infusion
($MW \pm SEM$; $n = 5$)*

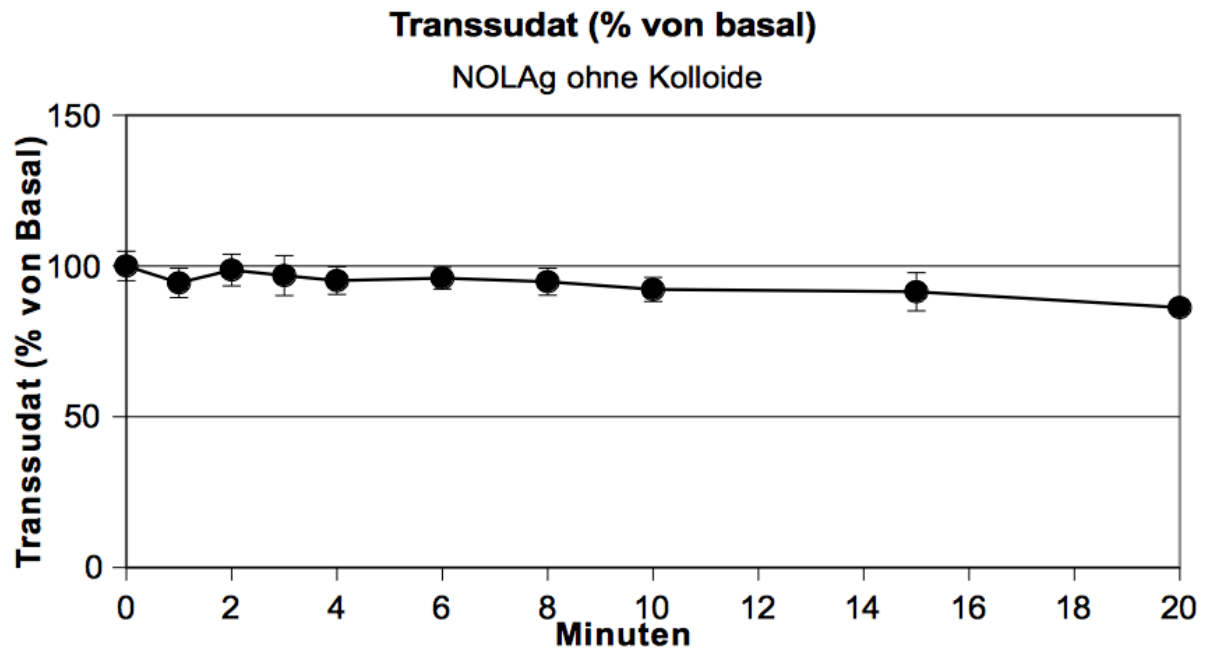


Abbildung 10.2: Transsudatbildung (% vom Basalwert)
unter NOLAg-Infusion ohne Kolloid-Infusion
($MW \pm SEM$; $n = 5$)

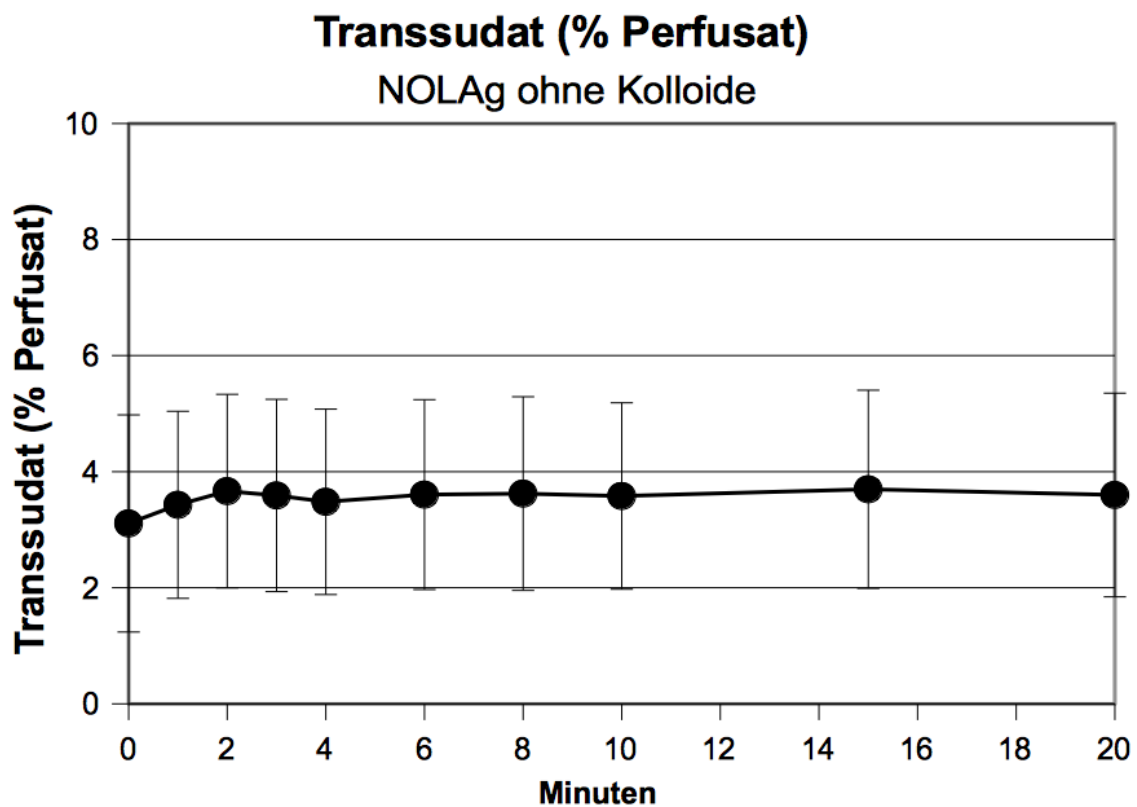


Abbildung 10.3: Transsudatbildung (% vom Coronarfluss)
unter NOLAg-Infusion ohne Kolloid-Infusion
($MW \pm SEM$; $n = 5$)

3.8 Elektronenmikroskopie

In den für diese Untersuchung durchgeführten elektronenmikroskopischen Darstellungen der Glykokalyx ließ sich in beiden Kolloid-Gruppen am Ende des Versuchsprotokolls ohne Intervention eine endotheliale Glykokalyx nachweisen (Abbildung 11A Humanalbumin und 11B HES). Ebenso kam es zu einer Darstellung einer Glykokalyx nach Applikation beider Kolloide nach 15minütiger warmer Ischämie (Abbildung 11C Humanalbumin und 11D HES). Nach Applikation von Heparinase dagegen ließ sich in keiner der beiden Versuchsgruppen eine endotheliale Glykokalyx mehr nachweisen (Abbildung 11E Humanalbumin und 11F HES).

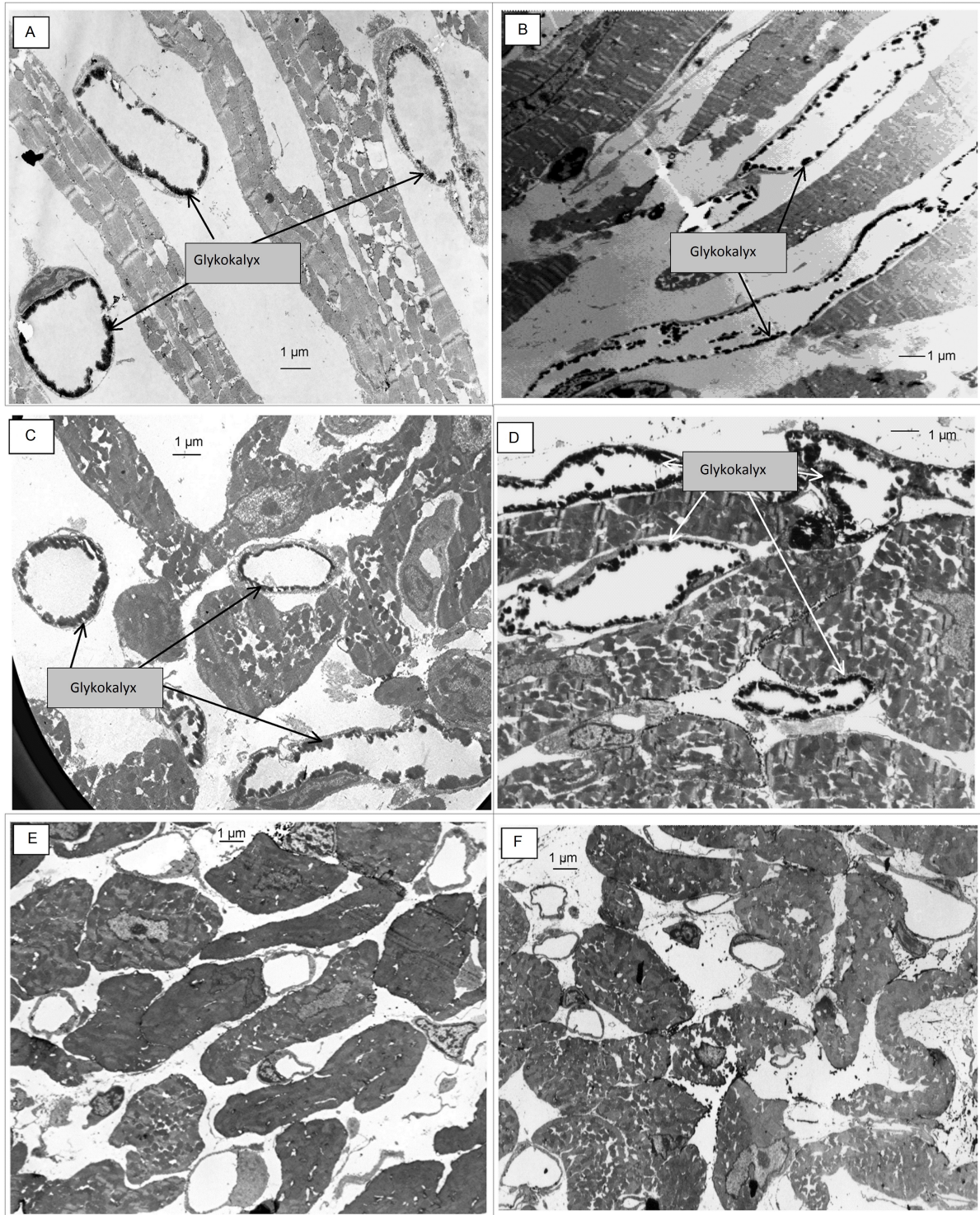


Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Darstellung der endothelialen Glykokalyx (modifiziert nach Rehm, 2003)

A, B: Herzen ohne Intervention

C, D: Herzen nach 15min Ischämie

E, F: Herzen nach Heparinase

4. Diskussion

4.1 Das „Shedding“ - Die Bedeutung der Glykokalyx in der Klinik

Die endotheliale Glykokalyx hat eine kritische Rolle für eine unbeeinträchtigte Gefäßfunktion inne. In Rahmen der intensiven Forschung zu diesem Thema wurden zunehmend mehr Noxen bekannt, welche die Glykokalyx alterieren bzw. schädigen können. Dieses sogenannte „Shedding“, also das Abstreifen von Glykokalyxbestandteilen von der endothelialen Zelloberfläche, kann von einer Abspaltung von Chondroitin- und Heparansulfat-Seitenketten bis zum Verlust der Syndekan- und Glypican-Kernproteine mitsamt ihrer zugehörigen Seitenketten führen (Becker et al. 2010). Aber auch eine Hypoalbuminämie im Rahmen einer Malnutrition, z.B. bei intensivmedizinischen Patienten, kann bereits den *endothelial surface layer* in seiner Funktion beeinträchtigen, da dieser nicht mehr ausreichend mit Kolloiden „aufgeladen“ wird.

Als Faktoren, welche die Glykokalyx schädigen können, wurden operatives Trauma, Hypoxie (Rehm et al. 2007, Annecke et al. 2011), aus Mastzellen freigesetzte Tryptase (Annecke et al. 2010), Endotoxin, C-reaktives Protein (CRP) (Hofmann-Kiefer et al. 2009, Wiesinger et al. 2013, Lipowsky et al. 2011, Lipowsky et al. 2012, Devaraj et al. 2009), Diabetes mellitus bzw. Hyperglykämie (Nassimizadeh et al. 2010, Lopez-Quintero et al. 2013, Nakagawa 2013), atriales natriuretisches Peptid (ANP) (Bruegger et al. 2005), (dialysepflichtiges) Nierenversagen (Vlahu et al. 2012, Nakagawa et al. 2013), hämorrhagischer Schock (Kozar et al. 2011), klinisch relevante Dosen von Heparin (van Teeffelen et al. 2007), und tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (Kupatt et al. 1999, Chappel, Hofmann-Kiefer et al. 2009) identifiziert. Eine solche Schädigung einer Schlüsselkomponente der endothelialen Barrierefunktion wiederum kann z.B. im Rahmen der Sepsis oder einer zu großzügigen

perioperativen Infusionstherapie entscheidende Folgen für den Krankheitsverlauf durch verstärkte Ödemneigung und Kolloidextravasation mit konsekutiv verschlechterter Gewebsoxygenierung mit sich bringen (Bruegger et al. 2005, Jacob et al. 2003, Rehm et al. 2001, Jacob et al. 2006, Annecke et al. 2011, Lipowsky 2012, Jacob, Chappell et al. 2007, Donati et al 2013). Vogel et al. wiesen in einer Arbeit nach, dass die endotheliale Glykokalyx zumindest im Hirn der Maus, mutmaßlich jedoch auch in anderen Organsystemen, einen entscheidenden Faktor des Gefäßwiderstands darstellt, ein Shedding also zu einer Reduktion des vaskulären Widerstands führt. (Vogel et al. 2000).

In der Sepsis besteht ein enger Zusammenhang zwischen Endothelschädigung und intravasaler Gerinnung. Bei einer Sepsis wird die endotheliale Glykokalyx zerstört (Nelson et al. 2008, Hofmann-Kiefer 2009). Einerseits fehlen die in der Glykokalyx eingebetteten antikoagulatorischen Faktoren, andererseits werden Leukozyten und Thrombozyten nicht mehr „auf Abstand“ gehalten, sondern können ungehindert mit den Rezeptoren der Endothelzelle, z.B. vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) oder intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), interagieren und somit eine inflammatorische bzw. thrombotische Reaktion initiieren. Die Schädigung der Glykokalyx durch inflammatorische Mediatoren stellt also wahrscheinlich eine Art Initialzündung dar: erst durch ein, über das normale Maß hinausgehendes, *shedding* werden Rezeptoren freigelegt, welche eine weitere Inflamationsreaktion induzieren können (Schouten et al. 2008, Jacob, Chappell et al. 2007, Becker et al. 2010, Lopez-Quintero et al. 2013). Salmon et al. konnten nachweisen, dass eine defekte Glykokalyx eine Albuminurie mitbedingt (Salomon et al. 2012).

Andererseits wurden aber zunehmend mehr Faktoren entdeckt, welche die Glykokalyx schützen oder sogar wiederherstellen können. So konnten Kozar et al. im Tiermodell zeigen, daß eine Frischplasmainfusion die endotheliale Glykokalyx im hämorrhagischen Schock wieder herstellen und Syndekan-1 schützen kann (Kozar et al. 2011). Weitere Maßnahmen, die ein pathologisch erhöhtes Shedding von Glykokalyxbestandteilen verringern können, sind

unter anderem die Prä- und Postkonditionierung mit Sevofluran (Chappell et al. 2011, Heindl et al. 1999, Annecke et al. 2010), eine Inhibierung von Matrix-Metallo-Proteinasen durch Doxycyclin (Kolářová et al. 2014), Hydrocortison (Chappell et al. 2007) und Antithrombin III (Chappell, Jacob, Becker et al. 2008, Chappell, Jacob, Hofmann-Kiefer et al. 2009). Auch Schubspannung hat einen wichtigen Einfluss auf die Organisation und das Nachwachsen der Glykokalyx (Giantsos-Adams et al. 2013, Zeng und Tarbell 2014).

4.2 Die Bedeutung des NO-Systems

1987 waren Palmer et al. die ersten, die den Beweis erbrachten, dass es sich bei dem sogenannten „endothelium-derived relaxing factor“ (ERDF) um NO handeln müsse (Palmer et al. 1987). Stickstoffmonoxid ist ein bioaktives, lipophiles Molekül, welches durch die Familie der NO-Synthasen aus der semi-essentiellen Aminosäure L-Arginin gebildet wird. Es existieren drei verschiedene Isoformen dieses Enzyms:

- eNOS: Die endotheliale NO-Synthase macht einen ständigen Bestandteil der Endothelzellen aus. Zudem wird sie in Thrombozyten, Endokard und Myokard exprimiert. Am Endothel bewirkt NO indirekt über eine Erhöhung des Spiegels von cGMP die Relaxation der Gefäßmuskulatur und somit eine Vasodilatation (Quinn et al. 1995).
- nNOS: Dies ist die neuronale Isoform der NO-Synthasen, auch sie ist ständig in den Neuronen vorhanden; NO dient als Neurotransmitter indem es den cGMP-Spiegel anhebt. In diesen Neuronen wird NO nach Stimulation des NMDA-Glutamat-Rezeptors freigesetzt. nNOS wird zudem von Skelettmuskelzellen exprimiert (Quinn et al. 1995).
- iNOS: Dieses Isoenzym, teils auch als mNOS (macrophage-type NOS) bezeichnet, wird in nicht stimulierten Makrophagen nicht exprimiert, sie ist jedoch induzierbar (daher der Name) durch eine ganze Reihe von Stimuli, z. B. Endotoxin oder diverse Cytokine wie z. B. TNF- α . In der Sepsis ist vermutlich von der iNOS freigesetztes NO für den Abfall des systolischen Blutdrucks verantwortlich. Auch fungiert NO als Radikal und trägt so zur Zellzerstörung im Rahmen des „oxidative burst“ der Makrophagen bei. Weiterhin lässt sich diese Isoform auch in Endothelzellen, glatten Muskelzellen des Gefäßsystems, Myozyten, neutrophilen Granulozyten und Astrozytomzellen nachweisen. iNOS produziert NO in quantitativ deutlich größeren

Mengen als die anderen zwei Isoformen (Jacob, Rehm et al. 2007, Cirino et al. 2003, Li und Förstermann 2000).

Die drei Isoenzyme der NO-Synthase besitzen eine aus zwei Domänen aufgebaute Struktur: Am N-terminalen Ende befindet sich eine Oxygenasedomäne mit Bindungsstellen für Häm, Tetrahydrobiopterin (BH₄) und L-Arginin. Diese Domäne wird über eine Calmodulin bindende Domäne mit der C-terminalen Reduktasedomäne verbunden, welche Bindungsstellen für Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), Flavinmononucleotid und NADPH beinhaltet. Weiterhin enthalten nNOS und eNOS, nicht aber iNOS eine selbstinhibierende Schleifendomäne, welche vermutlich die Ca²⁺-Calmodulin-Sensitivität des Enzyms reguliert. BH₄ fungiert als CoFaktor bei der Bildung von NO. In dessen Abwesenheit fungiert die NOS als NADPH-Oxidase, welche statt NO Superoxid und Wasserstoffperoxid synthetisiert (Cirino et al. 2003, Anderson 2003).

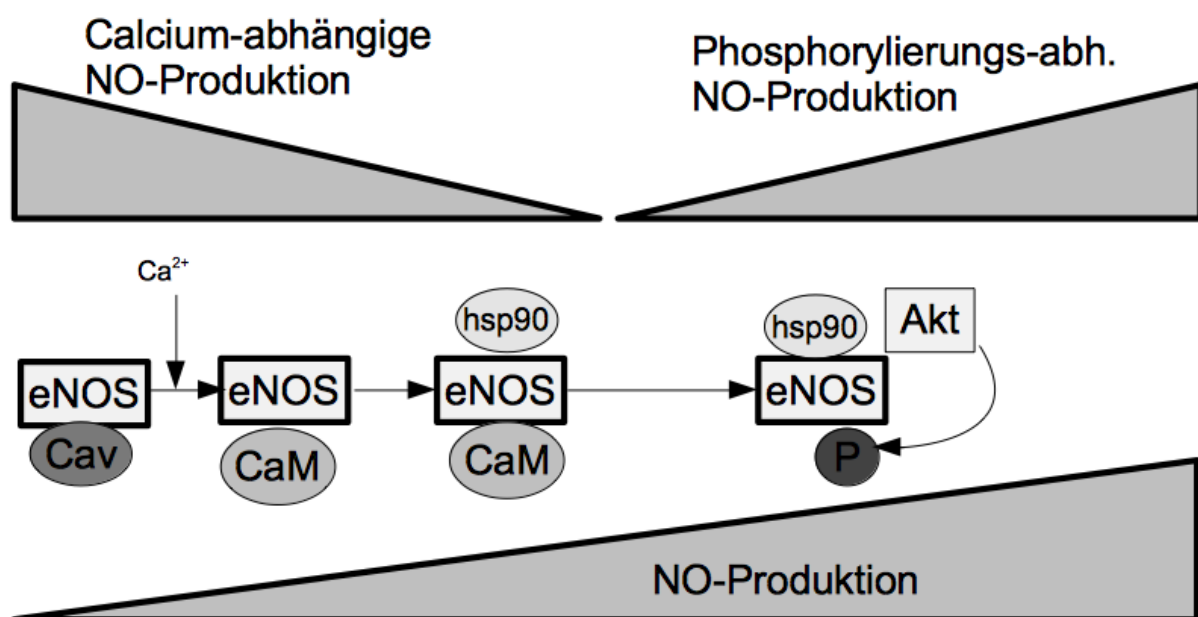


Abbildung 12: Schema der NO-Produktion durch eNOS (modifiziert nach Balligand et al. 2009)

eNOS befindet sich in Caveolae, 50-100 nm messenden Invaginationen der endothelialen Zellmembran. Hier bildet es einen Komplex mit Caveolin-1, welches als Inhibitor der eNOS fungiert. Diese Inhibierung kann auf verschiedenem Wege, z. B. durch heat shock Protein 90

oder auch Phosphorylierung der eNOS, beispielsweise durch Protein-Kinase-B (AKT), antagonisiert werden. Über Vermittlung von AKT steigert Insulin die NO-Produktion und führt so zu Vasodilatation und verbesserter Perfusion; zudem wird diesem Mechanismus eine antiapoptotische Wirkung im Ischämie-Reperfusion-Modell des Herzens zugesprochen (Cirino et al. 2003, Schmidt Dellamea, Bauermann Leitão et al. 2014, Noireaud et al. 2014). Im Gegensatz zur Wirkung von Insulin hat eine Hyperglykämie eindeutig negative Auswirkungen auf die Funktion der eNOS (Lopez-Quintero et al. 2013, Chappell, Jacob, Becker et al. 2008). Die Aktivität der eNOS ist weiterhin von der intrazellulären Ca^{2+} -Calmodulin-Konzentration abhängig, welche wiederum durch diverse Moleküle wie Acetylcholin, Substanz P oder Bradykinin beeinflusst wird. Lipopolysaccharid und $\text{TNF-}\alpha$ verringern die Genexpression von eNOS durch Verringerung der Stabilität von eNOS-mRNA (Schmidt Dellamea, Bauermann Leitão et al. 2014). Interessanterweise sind Guanidino-substituierte Analoga des L-Arginin, wie zum Beispiel Nitro-L-Arginin (NOLAg) in der Lage unspezifisch alle Isoformen der NOS zu hemmen (Jacob, Rehm et al. 2007). Auch auf die Endothelzellen wirkende Schubspannung kann Ionenkanäle aktivieren und so eine verstärkte Synthese von NO bewirken (Kumagai et al. 2009, Lopez-Quintero et al. 2009, Jacob, Rehm et al. 2007, Hsieh et al 2014).

Die, durch Schubspannung ausgelöste, von der eNOS katalysierte, Produktion von NO folgt einem biphasischen Verlauf: Erst erfolgt eine initiale starke NO-Produktion, welche nur Minuten dauert und über einen G-Protein-Calcium-abhängigen Mechanismus katalysiert wird; darauf folgt dann eine G-Protein-Calcium-*unabhängige* geringere NO-Freisetzung, welche sich in einem Zeitraum von Stunden abspielt. Die „Phase-1“-Reaktion ist dabei von der Veränderung des *shear levels* abhängig, nicht jedoch vom absoluten Niveau der Schubspannung; die Freisetzung von NO in der zweiten Phase dagegen ist abhängig von der Stärke der Schubspannung, nicht jedoch von ihrer Veränderung (Florian et al. 2003). Kang et

al. zeigten auf, dass Heparansulphate der Glykokalyx glatter Gefäßmuskelzellen eine wichtige Rolle bei der Mechanotransduktion von Scherkräften spielen (Kang et al. 2011).

Die Synthese von NO bewirkt eine basale Vasodilatation im pulmonalen und systemischen Kreislauf. Die Inhibition der NOS führt zu arterieller Vasokonstriktion und einem Anstieg des arteriellen Blutdrucks. Der Gefäßwiderstand und somit der arterielle Blutdruck sind vor Allem das Produkt aus aktiver Vasokonstriktion durch das sympathische Nervensystem und das Renin-Angiotensin einerseits und aktiver Vasodilatation über einen NO-vermittelten Mechanismus andererseits (Lopez-Quintero et al. 2009, Jacob, Rehm et al. 2007, Li und Förstermann 2000).

Weiterhin gibt es starke Hinweise darauf, dass eNOS die Interaktion zwischen dem Endothel und Entzündungszellen reguliert. Auch in Interaktion mit VEGF kommt der eNOS im Rahmen von Entzündungsreaktionen bei der Modulation von Gefäßpermeabilität und Angiogeneese eine entscheidende Rolle zu (Cirino et al. 2003). NO wirkt als potenter Inhibitor der Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten. Zudem unterbindet NO die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren aus den Thrombozyten, welche für die Proliferation glatter Muskulatur verantwortlich sind. Desweiteren kann NO die Expression von Oberflächen-Adhäsionsmolekülen wie z. B. P-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 reduzieren und über diesen Mechanismus die Adhäsion von Leukozyten am Endothel und ihre Migration in die Gefäßwand verhindern (Li und Förstermann 2000). Gen-Polymorphismen der eNOS werden als mit-ursächlich für die Entwicklung sowohl einer diabetischen Nephropathie als auch mehrerer Tumorarten betrachtet. (Schmidt Dellamea, Pinto et al. 2014, Wu et al. 2014)

In der Niere verringert NO die Rückresorption von Na^+ und antagonisiert die Vasopressin-vermittelte Permeabilität für Wasser im Sammelrohr. Desweiteren unterdrückt NO die Konversion von Angiotensin I in Angiotensin II durch Hemmung der Aktivität von ACE und Reduktion der Expression von ACE-mRNA. Zudem wird durch NO die basale Freisetzung von Aldosteron aus der Nebenniere verringert (Calderone 2003). Im chronischen

Nierenversagen ist die Produktion von NO deutlich reduziert, was zu kardiovaskulären Komplikationen und weiterer Nierenschädigung führen kann (Schmidt Dellamea, Bauermann Leitão et al. 2014).

In niedriger Dosierung bewirkt NO am Myokard einen positiv inotropen Effekt (Noireaud et al. 2014). Bruegger et al. konnten zeigen, dass NO in Anwesenheit einer intakten Glykokalyx einen positiven Effekt auf den Schaden nach Ischämie/Reperfusion besitzt (Bruegger et al. 2008). Die induzierbare NOS wird mit der Rolle, welche TNF- α beim Herzversagen spielt, in Verbindung gebracht. Hier kann NO über einen cGMP-unabhängigen Mechanismus zu Apoptose, verminderter Ventrikelkontraktilität und verschlechterter Endothelfunktion führen (Noireaud et al. 2014).

Störungen in der Bioverfügbarkeit von NO können endotheliale Dysfunktion verursachen, was in der Folge zu verstärkter Formation von atherosklerotischen Läsionen, Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und erhöhter Thromboseneigung führt (Schmidt Dellamea, Bauermann Leitão et al. 2014). Das 1847 von Ascanio Sobrero erstmalig im medizinischen Kontext eingeführte Glyceroltrinitrat war die erste NO-Donor-Substanz. Später folgten Präparate wie Natrium-Nitroprussid oder Isosorbid-Dinitrat. Diesen Substanzen sind jedoch unerwünschte Nebenwirkungen wie Kopfschmerz, Toleranzentwicklung oder der Anfall toxischer Metaboliten (Cyanid) zu eigen. Gegenwärtig wird daher an neuen NO-Donor-Substanzen auf Ruthenium-Basis geforscht (De Lima et al. 2014). Einige Symptome des septischen Schock, wie z. B. Hypotension, septische Cardiomyopathie, vaskuläre Hyporeaktivität und Gewebsschäden basieren zumindest zum Teil auf einer exzessiven NO-Produktion, ausgelöst durch TNF- α , Endotoxin, Interleukin-1 und -2. Im Plasma dieser Patienten ließen sich erhöhte Spiegel von Nitrat und cGMP nachweisen, welche beide als Marker für die NO-Produktion dienen. Bei septischen Patienten ließen sich Vasokonstriktion und eine Steigerung des Blutdrucks durch Infusion von NOS-Inhibitoren oder Methylenblau (einem Guanylat-Cyclase-Inhibitor) erreichen, jedoch führte nur eine niedrig dosierte

Blockade zu positiven Ergebnissen, eine komplette Blockade jedoch hatte verheerende Folgen für das Outcome (Quinn et al. 1995, Li et al. 2000, Calderone et al. 2003, Jacob, Rehm et al. 2007).

4.3 Die Ergebnisse im Kontext

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die endotheliale Glykokalyx eine relevante Rolle als Mechanosensor im Rahmen der schubspannungsassoziierten NO-Freisetzung am Endothel spielt; weiterhin ließ sich eine Interaktion von in der Klinik üblichen Kolloiden mit diesem System nachweisen.

Wie unter Punkt 1.1 bereits dargestellt, bedeckt die Glycocalyx die luminale endotheliale Oberfläche der Blutgefäße. Sie besteht aus Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykan-Seitenketten. Den größten Teil der Glykosaminoglykan-Seitenketten macht Heparansulfat mit circa 90% aus (Heindl et al. 1999, Kupatt et al. 1997, Rehm et al. 2007). Heparansulphat-Proteoglykane lassen sich, abhängig vom jeweiligen Kernprotein, mit welchem sie verknüpft sind, in drei Hauptgruppen aufteilen: Syndekane, Glypikane und Perlekane. Die größte Gruppe auf der endothelialen Oberfläche machen davon die Syndecane aus; sie sind auch die einzigen Bestandteile der Glykokalyx, die bis in das Zytoplasma der Endothelzelle eindringen und mit dem Zytoskelett in Interaktion treten. Von diesen wird vermutet, dass sie für die Signaltransduktion durch Scherkräfte verantwortlich sind, und zu einer Aktivierung der endothelialen NO-Synthetase (eNOS) führen; es wird also ein mechanischer Reiz in ein biochemisches Signal umgewandelt (Florian et al. 2003, Asundi und Carey 1995, Pohl et al. 1991, Tarbell und Pahakis 2007, Kumagai et al. 2009). NO führt in der glatten Muskulatur der Gefäße zu einer Absenkung der Ca^{2+} -Konzentration und damit zu einer Relaxation. Die schubspannungsabhängige NO-Freisetzung des Endothels ist als eine Form der vaskulären Autoregulation ein wichtiger Faktor für eine ausreichende basale Perfusion. Zudem wird über NO die Aktivierung von Leukozyten und Thrombozyten gehemmt und somit das Endothel geschützt.

Lopez-Quintero et al. sowie Pahakis et. al. wiesen nach, dass speziell Albumin über den CD44-Rezeptor einen entscheidenden Einfluss auf die hydraulische Leitfähigkeit des

Endothels unter Schubspannung hat (Lopez-Quintero et al. 2009, Pahakis et al. 2007). In einer weiteren Arbeit konnten Lopez-Quintero et al. 2013 nachweisen, dass hohe Glucosespiegel zu einer Abnahme der Menge an Heparansulphat innerhalb der Glykokalyx und einer damit einhergehenden Reduktion der schubspannungsvermittelten Endothelantwort und verminderter Aktivierung der eNOS führten (Lopez-Quintero et al. 2013). Chappell et al. hatten in der Vergangenheit am Modell des isolierten Meerschweinchenherzens gezeigt, dass eine Zerstörung der endothelialen Glykokalyx in jedem Fall zu einem erheblichen Gewebeödem mit konsekutiver Organdysfunktion führt (Chappell et al. 2007, Chappell, Jacob, Rehm et al. 2008).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen wurden am Modell des isolierten Meerschweinchenherzens bei druckkonstanter Perfusion durchgeführt. Sowohl die effektive Destruktion der endothelialen Glykokalyx mittels Heparinase, als auch die wirkungsvolle Inhibition der Funktion der endothelialen NO-Synthase mittels Nitro-L-Arginin sind hinlänglich etablierte Verfahren (Bruegger et al. 2005, Jacob et al. 2006, Florian et al. 2003, Dull et al. 2012). Während Albumin mit der endothelialen Glykokalyx den *endothelial surface layer* bildet, in dem ein relevanter Anteil des Plasma als nicht-zirkulierendes Plasmavolumen gebunden ist, können artifizielle Kolloide wie z. B. HES allenfalls einen rudimentären ESL bilden (Jacob et al. 2006, Jacob, Rehm et al. 2007, Becker et al. 2010). Es ließ sich in den hier durchgeführten Studien zeigen, dass die Infusion von Albumin zu einem bemerkenswerten Anstieg des Koronarflusses führte (+150%), ganz im Gegensatz zu einem künstlichen Kolloid, hier am Beispiel von HES (Molekulargewicht 450kD), bei dem es nur zu einem moderaten Anstieg des Koronarflusses kam (+5%). Albumin ist also in der Lage, eine deutlich stärkere Vasodilatation als das künstliche Kolloid Hydroxyethylstärke zu bewirken. Durch die Versuchsreihe mit Inhibierung der NO-Synthese via NOLAg in Abwesenheit von Kolloiden, ließ sich nachweisen, dass in unserem Versuchsmodell bereits bei alleiniger

Perfusion mit Krebs-Henseleit-Puffer eine basale NO-Produktion besteht, welche medikamentös durch Zugabe von Nitro-L-Arginin unterbrochen werden konnte.

Es ist davon auszugehen, dass das Phänomen der albumininduzierten Zunahme des Koronarflusses zu einem Großteil durch flussabhängige Änderung der Schubspannung über die endotheliale Glykokalyx vermittelt wird. Zumindest im Herz des Meerschweinchens müsste dies hauptsächlich zur Bildung von NO führen, da sich die flußabhängige Dilatation der Gefäße durch Blockade der NO-Synthase via NOLAg ebenso gut unterbinden ließ, wie durch Abtragung der endothelialen Glykokalyx mittels Heparinase, und zwar jeweils um 50%. Von besonderer Relevanz ist die Beobachtung, dass die Effekte dieser beiden Interventionen nicht additiv waren. Es erscheint daher eher unwahrscheinlich, dass zwei verschiedene Pathomechanismen im Spiel sind. Florian et al. konnten ebenfalls demonstrieren, daß Heparansulfat als Mechanosensor für eine schubspannungsassoziierte NO-Freisetzung via eNOS dient, und dass bereits eine 45%ige Reduktion der endothelialen Heparansulfatgruppen zu einer kompletten Hemmung der schubspannungsabhängigen NO-Liberation führte (Florian et al. 2003). Zudem scheint platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) am Prozess der Mechanotransduktion von Schubspannung beteiligt zu sein (Tarbell und Pahakis 2007).

Es fiel in den Versuchen auf, dass die durch Albumin ausgelöste Vasodilatation am Ende des Versuchsprotokolls noch nicht ihr Maximum erreicht hatte. Dies ließe sich möglicherweise über eine positive Rückkopplung erklären: Schubspannungsinduzierte NO-Freisetzung bedingt eine Vasodilatation, diese wiederum führt zu einem erhöhten Koronarfluss, in Folge dessen die Schubspannung weiter zunimmt.

In der Versuchsgruppe mit HES 450 ließ sich lediglich unter Infusion von NOLAg eine 5-10%ige Abnahme des Koronarflusses erreichen, die Infusion von Heparinase führte sogar zu einer leichten Zunahme des Koronarflusses (nicht signifikant). Ebenso bewirkte die Kombination von Heparinase und NOLAg keinen additiven Effekt. Es lässt sich also

vermuten, dass die großen HES-Moleküle selbst nach enzymatischer Abtragung eines Großteils der endothelialen Glykokalyx (der Heparansulfate durch Heparinase) mit dem verbliebenen Rest (vor Allem den Syndekanen) in Interaktion treten und eine gewisse NO-Freisetzung bewirken können. Möglicherweise wird dies sogar durch Abtragung der negativ geladenen Heparansulfatgruppen erleichtert, wonach das ebenfalls negativ geladene HES-Molekül weniger elektrostatische Abstossung erfährt und leichter mit der rudimentären Glykokalyx interagieren kann. Tatsächlich wiesen Chappell et al. 2008 nach, dass Heparinase lediglich die Heparansulfatgruppen der Glykokalyx abträgt, die Syndekane jedoch unbeeinträchtigt lässt (Chappell, Jacob, Rehm et al. 2008). Kumagai et al. konnten 2009 in einer Arbeit demonstrieren, dass auch die Hyaluronsäure-Bestandteile der Glykokalyx im Rahmen schubspannungsassoziierter NO-Freisetzung eine entscheidende Rolle spielten (Kumagai et al. 2009).

Ein herausragendes Merkmal des isoliert perfundierten Herzmodells ist, dass die Nettofiltration im intakten Koronargefäßbett direkt erfassbar ist. Wenn man nun die Bildung von Transsudat an der epikardialen Herzoberfläche betrachtet, so fällt auf, dass die Infusion von Albumin in allen Versuchsgruppen zu einer deutlichen Abnahme der Nettofiltration führte. In den Versuchen mit HES 450 ließ sich dieser Effekt nur in den Gruppen mit HES allein oder mit gleichzeitiger NOLAg Infusion darstellen. Auch bei Kombination der NOLAg-Infusion mit Heparinase kam es zu einer Abnahme des Transsudat-Perfusatverhältnisses. Im Gegensatz dazu kam es unter HES bei gleichzeitiger Anwendung von Ischämie und Heparinase (ohne NOLAg-Infusion) zu einer Zunahme der Nettofiltration im Sinne eines Lecks.

Dieses Ergebnis ist nicht einfach zu erklären: Man kann aber mutmaßen, dass sowohl Albumin als auch HES 450 über eine Vermittlung des Endothels eine Abnahme der koronaren Filtration verursachen, die endotheliale Glykokalyx also erst jetzt zum kompetenten *surface-layer* wird. Durch den „Einbau“ von Kolloiden in die Glykokalyx kann eine kolloid-

osmotisch wirksame Barriere - eben der ESL - gebildet werden. Die residuale Glykokalyx nach Behandlung mit Heparinase scheint zumindest im Fall von HES für diesen Effekt jedoch nicht mehr ausreichend potent zu sein.

Ebenso ist HES in Folge einer Ischämie nicht mehr in der Lage, das Transsudat/Perfusat-Verhältnis zu verringern. Um dies verständlich zu machen, muss man das „Double-Barrier-Modell“ heranziehen, welches Rehm et al. 2004 beschrieben (Rehm et al. 2004). Es besagt, dass sowohl die Endothelzelle, als auch die Glykokalyx eine kompetente Barriere gegen Flüssigkeitsextravasation bilden. Sollte nur eine der beiden Komponenten alteriert werden, wird die resultierende Nettofiltration nur geringgradig erhöht. In der aktuellen Versuchsreihe erscheint es nun so, dass HES450 beide Komponenten dieser double-barrier, also sowohl Endothelzelle als auch Glykokalyx in unbeschädigtem Zustand benötigt, um die Nettofiltration zu verringern. Albumin hingegen scheint bereits bei intakter Glykokalyx oder intakter Endothelzelle in der Lage zu sein, eine Abdichtung im Sinne einer Reduktion der koronaren Nettofiltration zu erreichen. Vermutlich genügen dem Albuminmolekül die auch nach Heparinasebehandlung verbleibenden Restbestände der endothelialen Glykokalyx, um eine abdichtende Wirkung entfalten zu können. Die HES-Moleküle können mit einer nurmehr residualen Glykokalyx nicht mehr interagieren und verlieren ihren abdichtenden Effekt. Da aber HES nur allein oder in Verbindung mit NOLAg eine Verringerung des Transsudat/Perfusat-Verhältnisses erreichen konnte, scheint die eNOS bei diesem Mechanismus im überwiegenden Teil der Fälle keine oder gar eine antagonisierende Rolle zu spielen. Auch ließ sich zeigen, dass NOLAg in Abwesenheit von Kolloiden keine Wirkung auf die Nettofiltration des Kapillarbettes hat.

In den Experimenten mit Ischämie kam es zu einer ausgeprägten reaktiven Erhöhung des Koronarflusses unmittelbar nach Wiedereinsetzen der Perfusion. Erwartungsgemäß war dieser Effekt unter HES-450-Infusion transient, das künstliche Kolloid verursachte keine

ausgeprägte Vasodilatation. M. Rehm konnte 2003 ein ähnliches Ergebnis auch in Versuchsreihen mit HES 200 (6%, Molekulargewicht 200 kD) darstellen (Rehm 2003).

Unter gleichzeitiger Infusion von Albumin dagegen kam es zu einer deutlichen Vasodilatation, der Koronarfluss blieb erhöht. Allerdings wurde hier ein *steady state* erreicht, im Gegensatz zur Versuchsreihe „Albumin ohne Ischämie“. Dieses *steady state* lag jedoch mit 253% des Basalflusses vor Intervention über dem 20-min-Wert von 229% ohne Intervention. Möglicherweise wäre also, ohne Intervention bei längerem Versuchsprotokoll ein ähnliches *steady state* erreicht worden.

In den vorliegenden Versuchsreihen ließen sich sehr starke Hinweise für eine durch Schubspannung ausgelöste NO-abhängige Vasodilatation am koronaren Endothel des Meerschweinchenherzens nachweisen. Dabei war die Wirkung von Humanalbumin deutlich stärker. Jacob et al. konnten bereits zeigen, dass die Freisetzung von NO sowohl von der dynamischen Viskosität als auch dem kolloidosmotischen Druck der eingesetzten Kolloide unabhängig ist (Jacob, Rehm et al. 2007). Mochizuki et al. wiesen 2003 am Modell isolierter Femoralarterien beim Hund nach, dass die endotheliale NO-Freisetzung in einem linearen Zusammenhang mit der Flussrate des Perfusats steht (Mochizuki et al. 2003).

Da auch die abdichtende Wirkung von Humanalbumin und HES 450 deutlich unterschiedlich war, muss es an der molekularen Struktur der einzelnen Kolloide liegen, dass deren Einsatz so unterschiedliche Reaktionen des Endothels zur Folge hatte. In einer weiteren Studie wiesen Jacob et al. nach, dass eine Supplementierung des Perfusats mit Albumin im Modell des Langendorffherzens ein deutlich geringeres Gewebsödem verursacht, als eine Verwendung von HES (Molekulargewicht 130kD) (Jacob et al. 2006).

Im Gegensatz zu Albumin, welches eine amphiphile Struktur mit sowohl positiven (Arginin, Lysin) als auch negativen (Carboxylatgruppen) Ladungen an der Oberfläche besitzt, weist Hydroxyethylstärke an ihrer Oberfläche zum überwiegenden Teil negativ geladene Gruppen auf. Während Albumin sich in Form des nicht zirkulierenden Plasmavolumens innerhalb der

endothelialen Glykokalyx verteilt (und so erst der ESL gebildet wird), stellt die Glykokalyx aufgrund ihrer vielen Sulfatgruppen eine Exklusionszone für anionische Moleküle wie Dextrane oder HES dar (Rehm et al. 2004, Jacob et al. 2006, Jacob, Rehm et al. 2007). Demzufolge lässt sich auch die unterschiedliche Wirkung der beiden Kolloide erklären: Humanalbumin tritt aufgrund seiner Struktur in eine starke Interaktion mit der Glykokalyx, während die größeren HES-Moleküle im Rahmen der Perfusion eher nur an deren Oberfläche entlang streichen können. Diese Hypothese, dass natürliche und artifizielle Kolloide signifikante Unterschiede in ihrer Interaktion mit der endothelialen Glykokalyx aufweisen, konnte Jacob et al. durch mehrere Arbeiten untermauern (Jacob et al. 2006, Jacob, Rehm et al. 2007).

Eine Behandlung mit Heparinase spaltet die Heparansulfate aus der Glykokalyx ab, es bleibt lediglich ein Grundgerüst aus Syndekanen und Glypikanen zurück; speziell den Heparansulfaten kommt jedoch eine entscheidende Rolle in der Mechanotransduktion der Scherkräfte in die Endothelzelle hinein zu (Lopez-Quintero et al. 2009). Florian et al. zeigten, dass eine enzymatische Digestion der Heparansulfate in ihrem Modell die schubspannungsassoziierte NO-Freisetzung völlig blockierte (Florian et al. 2003). Jedoch wurden diese Experimente an Zell-Monolayern durchgeführt, deren Fähigkeit zur Ausbildung einer Glykokalyx oder gar eines echten ESL mit entsprechender Funktionalität seit langem Thema intensiver Diskussionen ist. So konnten Chappell et al. 2009 in Zellkulturen aus venösen Nabelschnurendothelien (HUVEC) nur eine sehr dünne endotheliale Glykokalyx von < 20nm feststellen, wohingegen ganze Nabelschnurgefäße eine sehr dicke Glykokalyx (> 1000nm) aufweisen (Chappell, Jacob, Paul et. al 2009). Ähnliche Ergebnisse erbrachten Untersuchungen von Potter und Damiano 2008. Florian et al. (2003) hingegen wiesen in ihrer Arbeit mit bovinen Aorten-Endothelzell-Kulturen (BAEC) eine relevante Funktion der Heparansulfate der Glykokalyx als Mechanosensor nach, trotz der möglicherweise geringen Ausdehnung (Florian et al. 2003).

Aus den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten lässt sich die Schlussfolgerung ableiten, dass das HES-450-Molekül, aufgrund seiner Größe, mit der residualen Glykokalyx nach enzymatischer Digestion der Heparansulfate noch interagieren, sprich via Schubspannung eine NO-abhängige Vasodilatation auslösen, kann, denn dieser Effekt ließ sich unter Zugabe von NOAg wirksam unterbinden. Im Gegensatz dazu trat dieser Effekt in den Vergleichsexperimenten mit Albumin (ca. 70 kD) nicht auf: nach Behandlung mit Heparinase war die Vasodilatation unter Verwendung von Albumin durch NOAg nicht weiter hemmbar (Gruppen Hep und NOAg+Hep). Dieser Befund passt zu der angenommenen, ladungsabhängigen Interaktion von Albumin mit der intakten Glykokalyx. Einen interessanten Aspekt stellt die residuale, NOAg-unabhängige Flußsteigerung in Gegenwart von Albumin dar. Diese basale Vasodilatation weist auf eine Beteiligung von weiteren Mechanismen, vor Allem dem „*endothelium derived hyperpolarising factor*“ (EDHF) hin.

Diese Befunde haben eine relevante klinische Bedeutung: Sepsis, sowie Ischämie/Reperfusion sind alltägliche Krankheitsbilder, welche die Glykokalyx nachhaltig schädigen können. Das NO-System und speziell die schubspannungsassoziierte NO-Freisetzung sind für die Perfusion in der Mikrozirkulation im Sinne einer Homöostase von immenser Bedeutung. Betrifft die Schädigung lediglich die Heparansulphat-Seitenketten ist zumindest noch eine basale schubspannungsassoziierte Vasodilatation vorhanden. Bedingt der Schaden jedoch einen völligen Verlust der Syndekane und damit der „Grundpfeiler“ der Glykokalyx, so fällt auch diese Komponente der Regulation der Mikrostrombahn komplett aus; das in der Sepsis nur allzu bekannte Bild der Mikrozirkulationsstörung entsteht. Dies wird durch eine vermehrte Ödemneigung, sowie eine vermehrte Adhäsion von Zellen, was ebenfalls durch ein Fehlen der Glykokalyx erleichtert wird, weiter aggraviert. Erst ein Nachwachsen der endothelialen Glykokalyx, welches sich tierexperimentell durch Infusion von Frischplasma beschleunigen ließ, kann diesen Zustand wieder aufheben (Kozar et al. 2011).

4.4 Kritische Betrachtung der Methodik

Alle Experimente erfolgten in einem hoch-standardisierten robusten Setting. Allerdings wurden die Versuche lediglich mit einem mit Kolloiden angereicherten Perfusat durchgeführt, nicht jedoch mit Vollblut mit seinen korpuskulären Bestandteilen. Daher sind die gewonnenen Erkenntnisse nicht mit der Situation *in vivo* gleich zu setzen. Ob unsere Untersuchungen auch mit Vollblut zu einem gleichen Ergebnis gekommen wären, müsste erst noch durch Folgearbeiten dargestellt werden. Perfusionsversuche mit Vollblut sind aufgrund der aktiven Gerinnungskomponenten besonders diffizil bzw. gar nicht möglich *ex vivo*. Eine Antikoagulation mit Heparin hätte zudem einen direkten negativen Effekt auf die Integrität der endothelialen Glykokalyx gehabt (van Teeffelen et al. 2007), der in den vorliegenden Versuchsprotokollen vermieden werden konnte.

Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass in den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen mit Ischämie nur eine „relative“ warme Ischämie bestand, erzielt durch passive Erwärmung des Herzens durch einen umgebenden, auf 37°C gehaltenen Glaszylinder. Es fand keine Immersion der Herzen in 37°C warmer Flüssigkeit statt. Unter diesen Bedingungen führte die 15minütige Ischämie elektronenmikroskopisch nachweisbar nicht zu einer Destruktion der endothelialen Glykokalyx. Durch die technische Einschränkung scheint das Herz jedoch einen protektiven Effekt erfahren zu haben, weshalb sich selbst am Ende unserer Versuchsprotokolle mit Ischämie noch eine intakte Glykokalyx nachweisen ließ. In einer späteren, von Annecke et al. durchgeführten Arbeit ließ sich hingegen nach 20minütiger Ischämie mit Immersion in 37°C warmer Flüssigkeit eine Destruktion der Glykokalyx nachweisen (Annecke et al. 2011). Klinisch hat sich zudem gezeigt, dass die Dauer einer Ischämie entscheidet, wie ausgeprägt das Shedding der Glykokalyx ist (Rehm et al. 2007). Damit sind aber die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Effekte einer Ischämie auf die Funktion der Glykokalyx nicht maximal ausgeprägt.

5. Zusammenfassung

Die endotheliale Glykokalyx ist eine aus Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und Glykoproteinen aufgebaute Struktur, welche die luminal Seite des Endothels auskleidet. Hier erfüllt sie unterschiedlichste Funktionen, sei es die Aufrechterhaltung eines in das vaskuläre Lumen gerichteten Filtrationsgradienten, Verhinderung einer Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion durch Bedeckung der entsprechenden Adhäsionsmoleküle oder eine Modulation von Gefäßwiderstand und Gewebperfusion. Die Glykokalyx trägt einerseits direkt zum Widerstand eines Gefäßes bei, andererseits fungiert sie aber auch als Mechanosensor im Rahmen der Regulation des Blutflusses durch das NO-System, was speziell in der Mikrostrombahn Bedeutung hat. Kolloidale Infusionslösungen sind im täglichen klinischen Alltag verwendete Substanzen; durch ihre unterschiedliche Struktur und Netto-Ladung haben sie jedoch, bezüglich ihrer Interaktion mit der Glykokalyx und den davon abhängigen Mechanismen der Vasodilatation und -konstriktion unterschiedliche Wirkungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Langendorff-Modell des isolierten Meerschweinchenherzens untersucht, welchen Einfluss eine Veränderung der Schubspannung durch Infusion verschiedener Kolloide, exemplarisch dargestellt an Humanalbumin und HES 450, auf die Vasodilatation und Permeabilität des Endothels in An- und Abwesenheit einer Glykokalyx hat. Bei druck-konstanter Perfusion zeigt der Koronarfluss direkt an, ob Dilatation stattfindet. Die Nettofiltration im Gefäßbett wird durch das auf der epikardialen Herzoberfläche austretende Transsudat angezeigt. Es wurden insgesamt sieben verschiedene Versuchsgruppen gebildet; dabei wurde, mit Ausnahme der Versuchsgruppe „NOLAg ohne Kolloid“ jeweils Humanalbumin und HES 450 gegenübergestellt. Es ließ sich nachweisen, dass der Mechanotransduktion über die Glykokalyx, und insbesondere über deren Heparansulfatgruppen, ein NO-abhängiger Mechanismus zugrunde liegt.

- In Anwesenheit von Humanalbumin bzw. HES kam es in der Gruppe ohne weitere Intervention zu einem Anstieg des Koronarflusses auf Werte von 229% bzw. 117% des Ausgangswertes vor Kolloidapplikation. Albumin bewirkte hier verglichen mit HES 450 eine deutlich stärkere Reduktion des Transsudat-/Perfusatverhältnisses.
- Nach Applikation von Heparinase zur Abtragung der Glykokalyx kam es in beiden Versuchsgruppen zu einer deutlich weniger ausgeprägten Steigerung des Koronarflusses. Lediglich Albumin konnte noch eine abdichtende Wirkung im Sinne einer Reduktion des Transsudat-/Perfusatverhältnisses erzielen.
- Eine kontinuierliche Infusion von Nitro-L-Arginin zur Hemmung der eNOS während der Kolloid-Applikation reduzierte den Anstieg des Koronarflusses in beiden Armen dieses Protokolls sehr stark. Trotzdem war eine sehr deutliche abdichtende Wirkung beider Kolloide zu beobachten.
- Eine kombinierte Abtragung der endothelialen Glykokalyx mit Heparinase und eine NOLAg-Infusion während der Kolloid-Applikation erbrachten im Vergleich zu den einzelnen Interventionen „Heparinase“ und „NOLAg“ keinen additiven Effekt, was die Verringerung des Anstiegs des koronaren Flusses nach Kolloid-Applikation betraf. Jedoch konnte in diesem Versuchsprotokoll nur noch Albumin eine relevante Abdichtung des Endothels erreichen.
- Nach Ischämie kam es zu einer ausgeprägten Dilatation der Koronargefäße in der Albumin-Gruppe. Die resultierende Flusssteigerung ging sogar noch über die in der Gruppe ohne Intervention hinaus. In der HES-Gruppe ließ sich kein Unterschied im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nachweisen. Auch in dieser Versuchsgruppe wies lediglich Albumin eine abdichtende Wirkung auf.
- Eine Ischämie mit Heparinase führte in beiden Versuchsarmen zu einer Steigerung des Koronarflusses, welche mit der Heparinase-Gruppe vergleichbar ist. Auch hier konnte

lediglich Albumin eine abdichtende Wirkung erzielen, in der HES-Gruppe kam es sogar zu einem leichten Anstieg des Transsudat-/Perfusatverhältnisses.

- Eine Infusion von NOLAg ohne Applikation von Kolloiden führte *per se* zu einer Reduktion des Koronarflusses, eine abdichtende Wirkung ließ sich jedoch nicht beobachten.

Die Infusion von NOLAg zur Hemmung der endothelialen NO-Synthase bzw. von Heparinase zur Abtragung der Heparansulfate der Glykokalyx, konnte in den vorliegenden Versuchsreihen die durch Kolloide ausgelöste Vasodilatation deutlich reduzieren: Es kam zu einem Anstieg des koronaren Flusses auf 130% bzw. 150% des Basalwertes bei Verwendung von Albumin mit Heparinase bzw. NOLAg. Unter HES-Infusion fiel der Koronarfluss auf 110% bzw. 82% des Basalwertes nach Heparinase bzw. NOLAg ab. Im Fall von Albumin ließ sich die Vasodilatation also nicht völlig verhindern, demzufolge müssen von der eNOS unabhängige Faktoren zur Vasodilatation beitragen. Die durch Heparinase und NOLAg-Infusion ausgelösten Effekte auf den Koronarfluss waren nicht additiv, es ist daher äußerst wahrscheinlich, dass verschiedene Teilstücke des gleichen Mechanismus, nämlich einer schubspannungsassoziierten NO-abhängigen Vasodilatation, durch die Interventionen betroffen waren. Es ließ sich in der Versuchsserie ohne Kolloid-Applikation zudem nachweisen, dass bereits ohne relevanten Schubspannungseffekt eine basale NO-abhängige Vasodilatation besteht, welche sich durch NOLAg inhibieren ließ.

Humanalbumin und HES benötigen offensichtlich eine endotheliale Glykokalyx um über eine schubspannungsabhängige Induktion der eNOS eine Vasodilatation zu erreichen. Lediglich HES 450 konnte auch nach enzymatischer Abtragung der Heparansulfatgruppen einen geringen Dilatationseffekt über den NO-Mechanismus auslösen, aller Wahrscheinlichkeit nach über eine Interaktion mit dem verbleibenden „Grundgerüst“ der Glykokalyx, den Syndekanen. Albumin und HES haben eine positive Wirkung auf die Permeabilität des Endothels im Sinne einer „abdichtenden“ Wirkung: in Anwesenheit von Albumin sank das

Transsudat/Perfusatverhältnis um ca. 33%, unter HES um ca. 20%. Dieser Effekt ist jedoch in Anwesenheit des Albumin-Moleküls deutlich ausgeprägter als im Falle von HES, welches wahrscheinlich beide Komponenten der double barrier (Endothelzelle und Glykokalyx) in intaktem Zustand benötigt, um eine Abdichtung zu erzielen. Sind entweder Glykokalyx oder Endothelzelle geschädigt (wie nach milder Ischämie), hat HES keine abdichtende Wirkung mehr. Dieser Mechanismus der endothelialen Abdichtung scheint zudem von der eNOS unabhängig zu sein.

Es bestehen somit also deutliche Unterschiede zwischen natürlichem und artifiziellem Kolloid, hinsichtlich deren Interaktion mit der endothelialen Glykokalyx. Für die klinische Anwendung verspricht Albumin Vorteile gegenüber HES.

6. Abbildungsverzeichnis

1. Skizze der Struktur der endothelialen Glykokalyx
2. Aufbau der Langendorff-Anlage
3. Perfusionsprotokolle
4. Kolloide ohne Intervention:
 - 4.1 Koronarfluss (% vom Basalwert) ohne Intervention
 - 4.2 Transsudatbildung (% vom Basalwert) ohne Intervention
 - 4.3 Transsudatbildung (% vom Koronarfluss) ohne Intervention
5. Kolloide mit Infusion von Heparinase:
 - 5.1 Koronarfluss (% vom Basalwert) unter Heparinase
 - 5.2 Transsudatbildung (% vom Basalwert) unter Heparinase
 - 5.3 Transsudatbildung (% vom Koronarfluss) unter Heparinase
6. Kolloide mit Nitro-L-Arginin
 - 6.1 Koronarfluss (% vom Basalwert) unter NoLAg-Infusion
 - 6.2 Transsudatbildung (% vom Basalwert) unter NoLAg-Infusion
 - 6.3 Transsudatbildung (% vom Koronarfluss) unter NoLAg-Infusion
7. Kolloide mit Heparinase und NoLAg-Infusion
 - 7.1 Koronarfluss (% vom Basalwert) unter Heparinase + NoLAg-Infusion
 - 7.2 Transsudatbildung (% vom Basalwert) unter Heparinase + NoLAg-Infusion
 - Transsudatbildung (% vom Koronarfluss) unter Heparinase + NoLAg-Infusion
8. Kolloide nach 15minütiger Ischämie
 - 8.1 Koronarfluss (% vom Basalwert) nach Ischämie
 - 8.2 Transsudatbildung (% vom Basalwert) nach Ischämie
 - 8.3 Transsudatbildung (% vom Koronarfluss) nach Ischämie

9. Kolloide nach 15minütiger Ischämie und Heparinasebehandlung

9.1 Koronarfluss (% vom Basalwert) nach Ischämie + Heparinase

9.2 Transsudatbildung (% vom Basalwert) nach Ischämie + Heparinase

9.3 Transsudatbildung (% vom Koronarfluss) nach Ischämie + Heparinase

10. Infusion von Nitro-L-Arginin ohne Zusatz von Kolloiden

10.1 Koronarfluss (% vom Basalwert) unter NoLAg-Infusion ohne Kolloid

10.2 Transsudatbildung (% vom Basalwert) unter NoLAg-Infusion ohne Kolloid

10.3 Transsudatbildung (% vom Koronarfluss) unter NoLAg-Infusion ohne Kolloid

11. Elektronenmikroskopische Darstellung der endothelialen Glykokalyx

A: Nach Humanalbumin-Infusion ohne Interventionen

B: Nach HES-Infusion ohne Intervention

C: Nach Humanalbumin-Infusion und 15minütiger Ischämie

D: Nach HES-Infusion und 15minütiger Ischämie-bedingte

E: Nach Humanalbumin-Infusion und Heparinase-Applikation

F: Nach HES-Infusion und Heparinase-Applikation

12. Schema der NO-Produktion durch eNOS

7. Verzeichnis der Abkürzungen

ACE	angiotensin converting enzyme
AKT	Protein-Kinase-B
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AT3	Antithrombin III
BAEC	bovine aortic endothelial cell
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CRP	C-reaktives Protein
EDHF	endothelium derived hyperpolarising factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERDF	endothelium-derived relaxing factor
ESL	endothelial surface layer
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GAG	Glykosaminoglykan
HA	Humanalbumin
HES	Hydroxyethylstärke
HES 450	HES (Molekulargewicht 450 kD)
HEP	Intervention mit Heparinase-Applikation
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
I	Intervention mit Ischämie
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
iNOS	induzierbare NO-Synthase (= macrophage-type NOS)
I-HEP	Intervention mit Ischämie und Heparinaseapplikation
kD	Kilodalton
mNOS	siehe iNOS
mRNA	messenger-RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl der durchgeführten Versuche (im NoLAg-Protokoll)
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
n HA	Anzahl der durchgeführten Versuche in der Humanalbumin-Gruppe
n HES	Anzahl der durchgeführten Versuche in der HES-Gruppe
NO	Stickstoffmonoxid

nNOS	neuronal NO-Synthase
NOS	NO-Synthase
NOLAg	Nitro-L-Arginin
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1
SEM	Standardfehler
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor

8. Literaturverzeichnis

1. Anderson TJ: Nitric Oxide, Atherosclerosis and the Clinical Relevance of Endothelial Dysfunction. *Heart Failure Reviews*, 8, 71-86, 2003
2. Annecke T, Chappell D, Chen C, Jacob M, Welsch U, Sommerhoff CP, Rehm M, Conzen PF, Becker BF: Sevoflurane preserves the endothelial glycocalyx against ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Anaesthesia* 104 (4): 414-421 (2010)
3. Annecke T, Fischer J, Hartmann H, Tschoep J, Rehm M, Conzen P, Commerhoff CP, Becker BF: Shedding of the coronary endothelial glycocalyx: effects of hypoxia/reoxygenation vs. Ischaemia/reperfusion. *British Journal of Anaesthesia* 107 (5): 679-86 (2011)
4. Arkill KP, Neal CR, Mantell JM, Michel CC, Qvortrup K, Rostgaard J, Bates DO, Knupp C, Squire JM: 3D Reconstruction of the Glycocalyx Structure in Mammalian Capillaries using Electron Tomography. *Microcirculation* 2012 May; 19(4)
5. Asundi VK, Carey DJ: Self-association of N-syndecan (syndecan 3) core protein is mediated by a novel structural motif in the trans-membrane domain and ectodomain flanking region. *J Biol Chem* 1995; 270:26404-26410.
6. Bagchi A, Eikermann M: Mashed Potatoes and Maize – Are the Starches Safe?. *Anesthesiology*, 2013; 118: 244-7
7. Balligand JL, Feron O, Dessy C: eNOS Activation by Physical Forces: From Short-Term Regulation of Contraction to Chronic Remodeling of Cardiovascular Tissues. *Physiological Reviews* Published 1 April 2009 Vol. 89 no. 2, 481-534
8. Bansal M, Farrugia A, Balboni S, Martin G: Relative Survival Benefit and Morbidity with Fluids in Severe Sepsis – A Network Meta-Analysis of Alternative Therapies. *Current Drug Safety*, 2013, 8, 236-245
9. Becker BF, Chappell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M: Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovascular research* (2010) 87, 300-310
10. Boldt J, Suttner S: Plasma substitutes. *Minerva Anestesiologica* 2005;71:741-58
11. Bruegger D, Jacob M, Rehm M, Loetsch M, Welsch U, Conzen P, Becker BF: Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 Nov; 289(5): H 1993-9

12. Bruegger D, Rehm M, Jacob M, Chappell D, Stoecklhuber M, Welsch U, Conzen P, Becker BF: Exogenous nitric oxide requires an endothelial glycocalyx to prevent postischemic coronary vascular leak in guinea pig hearts. *Crit Care* 2008; 12(3): R73
13. Calderone A: The Therapeutic Effect of Natriuretic Peptides in Heart Failure; Differential Regulation of Endothelial and Inducible Nitric Oxide Synthases. *Heart Failure Reviews*, 8, 55-70, 2003
14. Chambers R, Zweifach BW: Intercellular cement and capillary permeability. *Physiol Rev.* 1947 Jul;27(3):436-63.
15. Chappell D, Bruchelt W, Schenk W, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Kreimeier U, Rehm M: Development of Spontaneous Subdural Hematoma and Bone Marrow Depression after Hydroxyethyl Starch Administration. *The Journal of Pediatrics* 2008; 53:579-81
16. Chappell D, Heindl B, Cacob M, Annecke T, Chen C, Rehm M, Conzen P, Becker BF: Sevoflurane Reduces Leukocyte and Platelet Adhesion after Ischemia-Reperfusion by Protecting the Endothelial Glycocalyx. *Anesthesiology* 2011; 115: 483-91
17. Chappel D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M, Rehm M, Briegel J, Welsch U, Conzen P, Becker BF: TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin *Basic Res Cardiol* 2009; 104:78-89
18. Chappell D, Jacob M, Becker BF, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Rehm M: Expedition Glykokalyx – Ein neu entdecktes „Great Barrier Reef“. *Anaesthesist* 2008, 57:959-969
19. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Bruegger D, Rehm M, Conzen P, Welsch U, Becker BF: Hydrocortisone Preserves the Vascular Barrier by Protecting the Endothelial Glycocalyx. *Anesthesiology* 2007; 107 776-784
20. Chappel D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Rehm M: A Rational Approach to Perioperative Fluid Management. *Anaesthesiology* 2008; 109: 723-740
21. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF: Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischemia/reperfusion. *Circovascular Research* 2009; 83: 388-396
22. Chappell D, Jacob M, Paul O, Rehm M, Welsch U, Stoeckelhuber M, Conzen P, Becker BF: The Glycocalyx of the Human Umbilical Vein Endothelial Cell: An Impressive Structure Ex Vivo but Not in Culture. *Circulation Research* 2009;104:1313-1317
23. Chappell D, Jacob M, Rehm M, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P, Becker BF: Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx. *Biol Chem*, 2008 Jan;389(1):79-82

24. Cirino G, Fiorucci S, Sessa WC: Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? Trends in Pharmacological Sciences Vol.24 No.2 February 2003: 91-95
25. Cordes DO, Santacruz C, Donadello K, Nobile L, Taccone FS: Colloids for fluid resuscitation: what is their role in patients with shock? Minerva Anestesiologica 2014, Vol. 80 – No. 8
26. Danielli JF: Capillary permeability and edema in the perfused frog. J Physiol (Lond) 1940 Mar 14; 98(1):109-129
27. de Lima RG, Siva BR, Da Siva RS, Bendhack LM: Ruthenium Complexes as NO Donors for Vascular Relaxation Induction. Molecules 2014, 19, 9628-9654; doi:10.3390/molecules19079628
28. de Mesy Bentley KL: An 11 μ m-thick Glycocalyx? It's All in the Technique! Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2011;31:1712-1713
29. Desjardins C, Duling BR: Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit Am J. Physiol 1990; 258: H647-H654
30. Devaraj S, Yun J-M, Adamson G, Galvez J, Jialal I: C-reactive protein impairs the endothelial glycocalyx resulting in endothelial dysfunction. Cardiovascular research (2009) 84, 479-484
31. Donati A, Domizi R, Damiani E, Adrario E, Pelaia P, Ince C: From Macrohemodynamic to the Microcirculation. Critical Care Research and Practice Vol. 2013, Article ID 892710
32. Dull RO, Cluff M, Kingston J, Hill D, Chen H, Hoehne S, Malleske DT, Kaur R: Lung heparan sulfates modulate K_{fe} during increased vascular pressure: evidence for glycocalyx-mediated mechanotransduction. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 302: L81-L828, 2012
33. Ebong EE, Macaluso FP, Spray DC, Tarbell JM: Imaging the Endothelial Glycocalyx *In Vitro* by Rapid Freezing / Freeze Substitution Transmission Electron Microscopy. Arterioscler Thromb Basic Biol. 2011 August; 31(8): 1908-1915
34. Fels J, Jeggle P, Liashkovich I, Peters W, Overleithner H: Nanomechanics of vascular endothelium. Cell Tissue Res (2014) 355:727-737
35. Finfer S: Clinical controversies in the management of critically ill patients with severe sepsis. Virulence 5:1, 200-205; January 1, 2014
36. Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM: Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. Circ Res 2003; 93:e136-e142
37. Giansos-Adams KM, Koo AJ-A, Song S, Sakai J, Sankaran J, Shin JH, Garcia-Cardena G, Dewey Jr. CF: Heparan sulfate regrowth profiles under laminar shear flow following

enzymatic degradation. Cellular and Molecular Bioengineering, Vol 6, No. 2 June 2013 pp. 160-174

38. Heindl B, Reichle FM, Zahler S, Conzen P, Becker BF: Sevoflurane and isoflurane protect the reperfused guinea pig heart by reducing postischemic adhesion of polymorphnuclear neutrophils. *Anesthesiology* 1999; 91: 521-30
39. Hofmann-Kiefer K, Kemming G, Chappel D, Kisch-Wedel H, Hauser A, Pallivathukal S, Conzen P, Rehm M: Serum heparan sulfate levels are elevated in endotoxemia. *European Journal of medical research* 2009; 14: 526-531
40. Hsieh H-J, Liu C-A, Huang B, Tseng AHH, Wang DL: Sheari-induced endothelial mechandotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications. *Journal of Biomedical Science* 2014, 21:3
41. Ihrcke NS, Wrenshall LE, Lindman BH, Platt JL: Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. *Immunol Today* 1993; 14:500-505
42. Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P, Becker BF: The enothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's priniple and high cardiac interstitial albumin levels. *Cardiovasc Res.* (2007) 73 (3): 575-586
43. Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF: Contrasting Effects of Colloid and Crystalloid Resuscitation Fluids on Cardiac Vascular Permeability. *Anesthesiology* 2006, 104: 1223-31
44. Jacob M, Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Peter K, Rehm M: Determinanten des insensiblen Flüssigkeitsverlustes. *Anaesthesist* 2007, 56:747-764
45. Jacob M, Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Helfen T, Schuelke A, Jacob B, Burges A, Conzen P, Rehm M: The intravascular volume effect of Ringer's lactate is below 20%: a prospective study in humans. *Critical Care* 2012, 16:R86
46. Jacob M, Chappell D, Rehm M: The 'third space' – fact or fiction?. *Best Practice & Research Clinical Anesthesiology* 2009; 23 145-157
47. Jacob M, Conzen P, Finsterer U, Krafft A, Becker BF, Rehm M: Technical and physiological Background of plasma volume measurement with indocyanine green: a clarification of misunderstandings. *J Appl Physiol* 2007; 102:1235-1242
48. Jacob M, Rehm M, Loetsch M, Paul JO, Bruegger D, Welsch U, Conzen P, Becker BF: The endothelial glycocalyx prefers albumin for evoking shear stress-induced, nitric oxide mediated coronary dilatation. *J Vasc Res.* 2007, 44(6): 435-43

49. Jacob M, Rehm M, Orth V, Lötsch M, Brechtelsbauer H, Weninger E, Finsterer U: Exakte Messung des Volumeneffektes von 6%iger Hydroxyethylstärke 130/0,4 (Voluven) während präoperativer akuter normovolämer Hämodilution. *Anaesthesist* 2003 52:896-904
50. Kang H, Fan Y, Deng X: Vascular smooth muscle cell glycocalyx modulates shear-induced proliferation, migration and NO production responses. *American Journal of Physiology*, January 1, 2011 vol. 300 no. 1 H76-H83
51. Kolářová H, Ambrůzová B, Šindlerová LŠ, Klinke A, Jubala L: Modulation of Endothelial Glycocalyx Structure under Inflammatory Conditions. *Mediators of Inflammation* Volume 2014, Article ID 694312
52. Kozek-Langenecker SA: Effects of Hydroxyethyl Starch Solutions on Hemostasis. *Anesthesiology* 2005; 103:654-60
53. Kozar RA, Zhanglong P, Rongzhen Z, Holcomb JB, Pati S, Park P, Ko TC, Paredes A: Plasma Restoration of Endothelial Glycocalyx in a Rodent Model of Hemorrhagic Shock. *Anesth Analg.* 2011 June; 112(6): 1289-1295
54. Kupatt C, Habazettl H, Zahler S, Weber C, Becker BF, Messmer K, Gerlach E: ACE-inhibition prevents postischemic coronary leucocyte adhesion and leucocyte-dependent reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1997; 36:386-395
55. Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A, Wolf DA, Zahler S, Boekstegers P, Kelly R, Becker BF: Tumor Necrosis Factor alpha Contributes to Ischemia- and Reperfusion-Induced Endothelial Activation in Isolated Hearts. *Circ Res.* 1999; 84:392-400
56. Kumagai R, Xiao L, Kassab GS: Role of Glycocalyx in Flow-Induced Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species. *Free Radic Biol Med*, 2009 47(5): 600-607
57. Latta T: Saline venous injection in cases of malignant cholera, performed while in the vapour-bath. *Lancet* 1832; 19:173-6
58. Li H, Förstermann U: Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *Journal of Pathology* 2000; 190: 244-254
59. Lipowsky HH: The Endothelial Glycocalyx as a Barrier to Leukocyte Adhesion and its Mediation by Extracellular Proteases. *Ann Biomed Eng.* 2012 April; 40(4): 840-848
60. Lipowsky HH, Gao L, Lescanic A: Shedding of the endothelial glycocalyx in arterioles, capillaries, and venules and its effect on capillary hemodynamics during inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301 H 2235-H2245, 2011
61. Lopez-Quintero S, Amaya R, Pahakis M, Tarbell J: The endothelial glycocalyx mediates shear-induced changes in hydraulic conductivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 May; 296(5): H1451-H1456

62. Lopez-Quintero SV, Cancel LM, Pierides A, Antonetti D, Spray DC, Tarbell JM: High Glucose Attenuates Shear-Induced Changes in Endothelial Hydraulic Conductivity by Degrading the Glycocalyx. *PLOS ONE*, November 2013
63. McDermid RC, Raghunathan K, Romanovsky A, Shaw AD, Bagshaw SM: Controversies in fluid therapy: Type, dose and toxicity. *World J Crit Care Med* 2014 February 4;3(1):24-33
64. Nakagawa T, Sato W, Kosugi T, Johnson RJ: Uncoupling of VEGF with Endothelial NO as a Potential Mechanism for Abnormal Angiogenesis in the Diabetic Nephropathy. *Journal of Diabetes Research*, Volume 2013, Article ID 184539
65. Nassimzadeh M, Ashrafi H, Drury NE, Howell NJ, Digby J, Pagano D, Frenneaux M, Born GVR: Reduced negative surface charge on arterial endothelium explains accelerated atherosclerosis in type 2 diabetic patients. *Diabetes and Vascular Disease Research* 2010 7:213-215
66. Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, Ljunggren L, Bodelsson M: Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock*. 2008 Dec; 30(6): 623-7.
67. Noireaud J, Andriantsitohaina R: Recent Insights in the Paracrine Modulation of Cardiomyocyte Contractility by Cardiac Endothelial Cells. *BioMed Research International* Volume 2014, Article ID 923805
68. Nolan J: Fluid Replacement. *British Medical Bulletin* 1999, 55 (No 4) 821-843
69. Pahakis MY, Kosky JR, Dull RO, Tarbell JM: The Role of Endothelial Glycocalyx Components in Mechanotransduction of Fluid Shear Stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 March 30; 355(1): 228-233
70. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6.
71. Pohl U, Herlan K, Huang A, Bassenge E: EDRF-mediated shear-induced dilation opposes myogenic vasoconstriction in small rabbit arteries. *Am J Physiol* 1991; 261: H2016-H2023
72. Potter DR, Damiano ER: The Hydrodynamically Relevant Endothelial Cell Glycocalyx Observed In Vivo Is Absent In Vitro. *Circ. Res.* 2008;102:770-776
73. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P: The endothelial surface layer. *Pflügers Arch* 2000; 440: 653-666
74. Pries AR, Secomb TW: Microvascular blood viscosity in vivo and the endothelial surface layer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, Dec; 289: H2657-H2664
75. Quinn AC, Petros AJ, Vallance P: Nitric oxide: an endogenous gas. *British Journal of Anaesthesia* 1995;74:443-451

76. Rehm M: Anwendungsbeschränkung für Hydroxyethylstärke. Hintergründe und alternative Konzepte. *Anaesthesist* 2013 62:644-655
77. Rehm M: Volumeneffekte kolloidaler Infusionslösungen (Albumin5% und Hydroxyethylstärke 6%) Einfluss der endothelialen Glykokalyx. 2003
78. Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, Chappell D, Stoeckelhuber M, Welsch U, Reichart B, Peter K, Becker BF: Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation* 2007, 116:1896-1906
79. Rehm M, Orth VH, Kreimeier U, Thiel M, Mayer S, Brechtelsbauer H, Finsterer U: Veränderung des Blutvolumens während akuter normovolämer Hämodilution mit 5% Albumin oder 6% Hydroxyethylstärke und intraoperativer Retransfusion. *Anaesthesist* 2001 50:569-579
80. Rehm M, Zahler S, Lötsch M, Welsch U, Conzen P, Jacob M, Becker BF: Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology* 2004 May; 100(5): 1211-23
81. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA: The endothelial glycocalyx: composition, functions and visualization. *Eur J Physiol* (2007) 454:345-359
82. Salmon AHJ, Ferguson JK, Burford JL, Gevorgyan H, Nakano D, Harper SJ, Bates DO, Peti-Peterdi J: Loss of the Endothelial Glycocalyx Links Albuminuria and Vascular Dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23: 1339-1350, 2012
83. Schlimp CJ, Cadamuro J, Solomon C, Redl H, Schöchl H: The effect of fibrinogen concentrate and factor VIII on thrombelastometry in 33% diluted blood with albumin, gelatine, hydroxyethyl starch or saline in vitro. *Blood Transfus* 2013; 11: 510-7
84. Schmidt Dellamea B, Bauermann Leitão C, Friedmann R, Canani LH: Nitric oxide system and diabetic nephropathy. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2014, 6:17
85. Schmidt Dellamea B, Pinto LCF, Bauermann Leitão C, Gonçalves Santos K, Santos Canani LH: Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of diabetic nephropathy: a systematic review and meta-analysis. *BMC Medical Genetics* 2014, 15:9
86. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi, M, van der Poll T: Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *Journal of Leukocyte Biology* 2008 83: 536-545
87. Seiichi Mochizuki, Hans Vink, Osamu Hiramatsu, Tatsuya Kajita, Fumiyuki Shigeto, Jos A.E. Spaan, Fumihiko Kajiya: Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced

endothelium-derived nitric oxide release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H722-H726, 2003

88. Sörensson J, Matejka GL, Ohlson M, Haraldsson B: Human endothelial cells produce orosomucoid, an important component of the capillary barrier. *Am. J. Physiol.* 276 (Heart Circ. Physiol. 45): H530-H534, 1999

89. Tarbell JM, Pahakis MY: Mechanotransduction and the glycocalyx. *J Intern Med* 2007; 259:339-350

90. van den Berg BM, Vink H, Spaan JA: The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circ Res* 2003; 92: 592-594

91. van den Berg B, Nieuwdorp M, Stroes ESG, Vink H: Glycocalyx and endothelial (dys) function: from mice to men. *Pharmacological Reports* 2006, 58, suppl., 75-80

92. VanTeeffelen JWGE, Brands J, Jansen C Spaan JAE, Vink H: Heparin Impairs Glycocalyx Barrier Properties and Attenuates Shear Dependent Vasodilation in Mice. *Hypertension* 2007;50:261-267

93. Vincent JL, Gottin L: Type of fluid in severe sepsis and septic shock. *Minerva Anesthesiologica* 2011, Vol. 77 – No. 12:1190-96

94. Vlahu CA, Lemkes BA, Struijk DG, Koopmann MG, Krediet RT, Vink H: Damage of the Endothelial Glycocalyx in Dialysis Patients. *J Am Soc Nephrol* 23: 1900-1908, 2012

95. Vogel J, Sperandio M, Pries AR, Linderkamp O, Gaetgens P, Kuschinsky W: Influence of the Endothelial Glycocalyx on Cerebral Blood Flow in Mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20:1571-1578

96. Waxman K, Tremper KK, Mason R: Blood and Plasma Substitutes – Plasma Expansion and Oxygen Transport Properties (Medical Progress). *Western Journal of Medicine* 1985 Aug; 143:202-206

97. Westphal M, James MFM, Kozek-Langenecker S, Stocker R, Guidet B, van Aken H: Hydroxyethyl Starches. *Anesthesiology* V 111, No 1, Jul 2009

98. Wienen W, Jungling E, Kammermeier H. (1994) Enzyme release into the interstitial space of the isolated rat heart induced by changes in contractile performance *Cardiovasc. Res*; 28:1292-1298

99. Wiesinger A, Peters W, Chappel D, Kentrup D, Reuter S, Pavenstädt H, Oberleithner H, Kümpers P: Nanomechanics of the Endothelial Glycocalyx in Experimental Sepsis. *PLoS One*. 2013; 8(11): e80905

100. Woodcock TE, Woodcock TM: Revised Starling equation and the glycocalyx model of transvascular fluid exchange: an improved paradigm for prescribing intravenous fluid therapy. *British Journal of Anesthesia* 2012, 108 (3): 384-394
101. Wu X, Wang Z-F, Xu Y, Ren R, Heng B-L, Su Z-X: Association Between Three eNOS Polymorphisms and Cancer Risk: a Meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* (2014), 15 (13), 5317-5324
102. Zeng Y, Tarbell JM (2014): The Adaptive Remodeling of Endothelial Glycocalyx in Response to Fluid Shear Stress. *PloS ONE* 9(1): e86429. Doi:10/1371/journal.pone0086249

9. Danksagung

Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Bernhard F. Becker und Professor Dr. med. Markus Rehm danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die interessanten brainstormings, welche die weitere Ausrichtung der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente ergaben.

Meinem Betreuer Herrn Professor Rehm möchte ich für seine unendliche Geduld, Motivation und Unterstützung beim langwierigen Entstehen dieser Arbeit danken; er war auch verantwortlich für die Akquisition der finanziellen Mittel, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Ein herzliches Dankeschön an Herrn Professor Noseleit von der Universität Groningen (NL) für seine Unterstützung bei der Erstellung der statistischen Auswertung.

Frau Veronika Frei und Ursula Göttler danke ich herzlichst für die technische Unterstützung und die Einarbeitung eines Laien in die Arbeitsabläufe eines Forschungslabors.

Der Anatomischen Anstalt der LMU München (Lehrstuhl Prof. U. Welsch) möchte ich herzlichen Dank sagen für die Ermöglichung der elektronenmikroskopischen Darstellung der Glykokalyx in den hier vorgenommenen Versuchen. In diesem Zusammenhang sei zu dem Herrn Professor Dr. Stefan Zahler zu nennen, der mich in die Fixierungstechniken in Vorbereitung der Elektronenmikroskopie einwies.

Letztlich möchte ich besonders meinen Eltern Dres. med. Angela und Volker Lötsch für die beharrliche Motivation zur Fertigstellung dieser Arbeit und ihre finanzielle Unterstützung, welche mein Studium erst ermöglichten, danken.